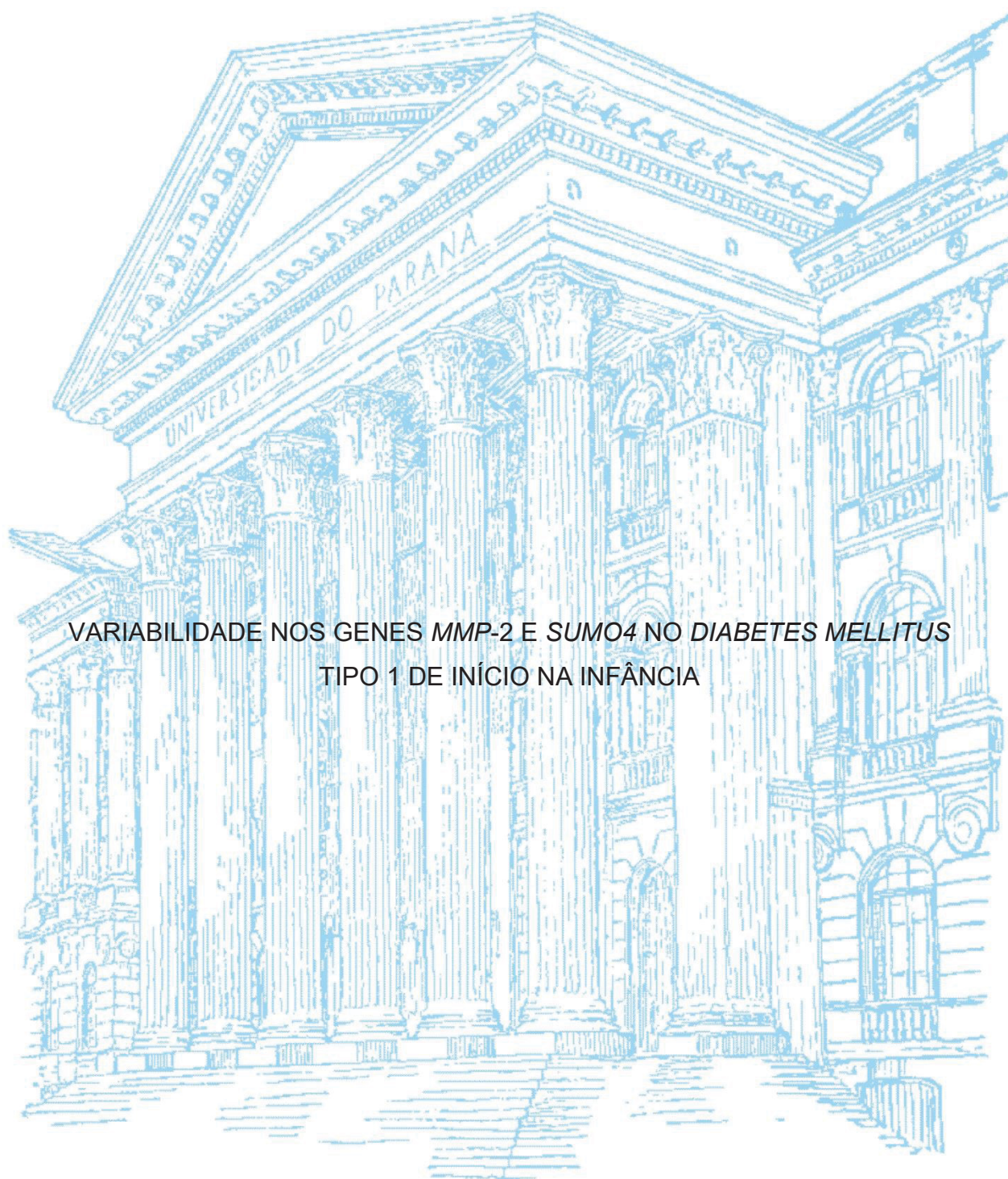


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATEUS SANTANA LOPES



VARIABILIDADE NOS GENES *MMP-2* E *SUMO4* NO *DIABETES MELLITUS*  
TIPO 1 DE INÍCIO NA INFÂNCIA

CURITIBA

2020

MATEUS SANTANA LOPES

VARIABILIDADE NOS GENES *MMP-2* E *SUMO4* NO *DIABETES MELLITUS*  
TIPO 1 DE INÍCIO NA INFÂNCIA

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de mestre em Ciências  
Farmacêuticas, no programa de Pós-Graduação em  
Ciências farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,  
da Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Profª Drª Fabiane G. de M. Rego  
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2020

Lopes, Mateus Santana  
Variabilidade nos genes *MMP-2* e *SUMO4* no *Diabetes mellitus tipo 1* de início na infância [recurso eletrônico] / Mateus Santana Lopes – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane G. de M. Rego

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Metaloproteinase 2 da Matriz. 3. Proteína SUMO-4. 4. Polimorfismo genético. I. Rego, Fabiane G. de M. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 618.924622

Leonardo Talone Neto

CRB 9/1977



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATEUS SANTANA LOPES** intitulada: **Variabilidade nos genes MMP-2 e SUMO4 no Diabetes mellitus tipo 1 de início na infância**, sob orientação da Profa. Dra. **FABIANE GOMES DE MORAES REGO**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2020.

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MAUREN ISFER ANGHEBEM

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Por me dar força e coragem nos momentos mais difíceis desta jornada, Deus – a quem eu devo todo o êxito deste trabalho –, obrigado por se fazer presente em minha vida.

Aos meus pais Cidália e Luiz Antônio, que sempre me incentivaram, me deram apoio incondicional e que acreditam numa capacidade que duvido que tenho.

Aos professores doutores Fabiane Gomes de Moraes Rego, Geraldo Picheth e Dayane Alberton, do grupo de pesquisa em doenças metabólicas, por todo conhecimento e suporte durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de bioquímica clínica que se fizeram essenciais por sua cumplicidade e companheirismo: Susan, Bruna, Louryana, Thanise, Yusra, Liliane, Susane e Christiane.

Aos amigos de outros laboratórios que compartilharam comigo alguns dos melhores momentos do curso de mestrado, em especial à Elisiane e Fabiula.

Aos alunos de iniciação científica Sabrina, Eduardo e Greice que fizeram parte deste processo e que trocaram conhecimentos e experiências ao longo deste período.

Às agências de fomento por todo o suporte financeiro, à Universidade Federal do Paraná e ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas e todos os seus professores e colaboradores.

Às professoras Doutoras Mauren Isfer Anghebem e Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss por aceitarem integrar a minha banca e contribuir, com seu conhecimento, para o enriquecimento deste trabalho.

“Toda coragem precisa  
De um medo para existir.  
Uma estranha dependência  
Complicada de sentir.  
A coragem de levantar  
Vem do medo de cair”

Bráulio Bessa



## RESUMO

O *Diabetes mellitus* é uma doença crônica, complexa, heterogênea e multifatorial, que está associado a elevada morbimortalidade e é caracterizado por hiperglicemia resultante da produção insuficiente, secreção defeituosa, ação irregular ou resistência de tecidos alvo ao hormônio insulina, produzido pelas células  $\beta$  do pâncreas. O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma desordem complexa associada a processos autoimunes resultantes de fatores ambientais e genéticos. O DM1 afeta indivíduos em idade precoce (crianças e adolescentes) e sua incidência tem aumentado entre adultos com idade superior a 18 anos. O DM1 é uma doença poligênica e variações genéticas presentes nos genes *MMP-2* (rs2285053 e rs243865) e *SUMO4* (rs237025) foram associadas à sua etiologia ou complicações. Este estudo objetivou avaliar parâmetros bioquímicos e os polimorfismos rs2285053 e rs243865 no gene *MMP-2* e rs237025 no gene *SUMO4* em um estudo tipo caso-controle constituído de uma amostra de crianças saudáveis e com diabetes mellitus tipo 1 de Euro-Brasileiros. O projeto teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR (CAAE: 24676613.6.0000.0102). A genotipagem foi feita por meio da técnica de PCR-RFLP. O alelo T do polimorfismo rs2285053 no gene *MMP-2* foi associado à proteção ao DM1 no grupo controle ( $P=0,003$ ). O polimorfismo rs243865 no gene *MMP-2* não foi associado a risco ou proteção ao DM1, mas indivíduos portadores do alelo T (CT e TT) no grupo DM1 apresentaram maiores concentrações de HDL-colesterol ( $P=0,002$ ) quando comparados aos portadores do genótipo CC. Ambos os alelos, alelo G e alelo A, do polimorfismo rs237025 no gene *SUMO4* não foram associados à proteção ou risco para o DM1 ( $P=0,774$ ) na população estudada. As frequências destes polimorfismos estão dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg e seus alelos de menor frequência foram comparados com os de outras populações e, de forma geral, se assemelharam, principalmente, às frequências de caucasoides e, em alguns casos, às de orientais.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus* tipo 1. *MMP-2*. *SUMO4*. Polimorfismos.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic, complex, heterogeneous and multifactorial disease that is associated with high morbidity and mortality and is characterized by hyperglycemia resulting from insufficient production, defective secretion, irregular action or resistance of target tissues to the hormone insulin, produced by the  $\beta$  cells of the pancreas. . Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a complex disorder associated with autoimmune processes resulting from environmental and genetic factors. DM1 affects individuals at an early age (children and adolescents) and its incidence has increased among adults over 18 years of age. DM1 is a polygenic disease and genetic variations present in the MMP-2 (rs2285053 and rs243865) and SUMO4 (rs237025) genes have been associated with its etiology or complications. This study aimed to evaluate biochemical parameters and the rs2285053 and rs243865 polymorphisms in the MMP-2 gene and rs237025 in the SUMO4 gene in a case-control study comprising a sample of healthy children with type 1 diabetes mellitus from Euro-Brazilians. The project was approved by the UFPR Research Ethics Committee (CAAE:24676613.6.0000.0102). Genotyping was performed using the PCR-RFLP technique. The T allele of the rs2285053 polymorphism in the MMP-2 gene was associated with DM1 protection in the control group ( $P=0.003$ ). The rs243865 polymorphism in the MMP-2 gene was not associated with risk or protection for DM1, but individuals carrying the T allele (CT and TT) in the DM1 group had higher concentrations of HDL-cholesterol ( $P=0.002$ ) when compared to those with the genotype CC. Both alleles, allele G and allele A, of the rs237025 polymorphism in the SUMO4 gene were not associated with protection or risk for DM1 ( $P=0.774$ ) in the studied population. The frequencies of these polymorphisms are within the Hardy-Weinberg equilibrium and their lower frequency alleles were compared with those of other populations and, in general, were similar, mainly, to the frequencies of Caucasians and, in some cases, of Orientals.

**Key words:** Type 1 Diabetes mellitus. MMP-2. SUMO4. Polymorphisms.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Prevalência e projeção global do <i>Diabetes mellitus</i> .....	20
FIGURA 2 - Complicações sistêmicas do Diabetes .....	26
FIGURA 3 - Progressão do <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 .....	33
FIGURA 4 - Mecanismos imunológicos envolvidos no DM1 .....	37
FIGURA 5 - Localização do gene <i>MMP-2</i> e dos polimorfismos rs2285053 e rs243865 .....	49
FIGURA 6 - Localização do gene <i>SUMO4</i> e do polimorfismo rs237025 .....	52
FIGURA 7 - Regulação de I $\kappa$ B $\alpha$ por fosforilação e sumorilação.....	53
FIGURA 8 - Fluxograma de trabalho .....	55
FIGURA 9 - Sítios de reconhecimento das enzimas de restrição.....	61
FIGURA 10 - Mapa de digestão e caracterização dos genótipos obtidos pela digestão com a enzima <i>HinfI</i> para o polimorfismo rs2285053 .....	71
FIGURA 11 - Perfil eletroforético dos produtos de restrição para o polimorfismo rs2285053 do gene <i>MMP-2</i> .....	72
FIGURA 12 - Mapa de digestão e caracterização dos genótipos obtidos pela digestão com a enzima <i>XspI</i> para o polimorfismo rs243865 .....	75
FIGURA 13 - Perfil eletroforético dos produtos de restrição para o polimorfismo rs243865 do gene <i>MMP-2</i> .....	76
FIGURA 14 - Associação dos genótipos CT+TT do polimorfismo rs243865 e as concentrações séricas de HDL-colesterol no grupo DM1 .....	78
FIGURA 15 - Mecanismo de ruptura da sequência consenso SP1 pelos polimorfismos funcionais da região promotora do gene <i>MMP-2</i> rs2285053 e rs243865 .....	79
FIGURA 16 - Mapa de digestão e caracterização dos genótipos obtidos pela digestão com a enzima <i>MseI</i> para o polimorfismo rs237025 .....	81
FIGURA 17 - Perfil eletroforético dos produtos de restrição para o polimorfismo rs237025 do gene <i>SUMO4</i> .....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados antropométricos de crianças controle e DM1 .....	64
TABELA 2 - Concentrações séricas dos biomarcadores para os grupos em estudo .....	66
TABELA 3 - Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo rs2285053 nos grupos em estudo.....	72
TABELA 4 - Comparação das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs2285053 do gene <i>MMP-2</i> com a literatura .....	73
TABELA 5 - Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo rs243865 nos grupos em estudo.....	76
TABELA 6 - Comparação das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs243865 do gene <i>MMP-2</i> com a literatura .....	77
TABELA 7 - Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo rs237025 nos grupos em estudo.....	82
TABELA 8 - Comparação das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs237025 do gene <i>SUMO4</i> com a literatura .....	83

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Critérios para o diagnóstico do <i>Diabetes mellitus</i> .....	28
QUADRO 2 - Caracterização dos polimorfismos estudados .....	57
QUADRO 3 - Protocolo utilizado para genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo rs2285053 do gene <i>MMP-2</i> .....	58
QUADRO 4 - Protocolo utilizado para genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo rs243865 do gene <i>MMP-2</i> .....	59
QUADRO 5 - Protocolo utilizado para genotipagem por PCR-RFLP do polimorfismo rs237025 do gene <i>SUMO4</i> .....	60
QUADRO 6 - Protocolo utilizado para reação de restrição dos polimorfismos rs2285053, rs243865 e rs237025.....	61
QUADRO 7 - Parâmetros bioquímicos avaliados (princípio metodológico, coeficiente de variação e intervalo de referência) .....	62

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1 - Parecer do comitê de ética em pesquisa .....	107
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de diabéticos acima de 12 anos .....	110
ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para assinatura dos pais .....	113
ANEXO 4 - Questionário utilizado para coleta de dados dos pacientes .....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS

1,5-AG	1,5-anidroglucitol
ADA	<i>American Diabetes Association</i> ; Associação americana de diabetes
AGE	<i>Advanced Glycation End-Products</i> ; produtos finais de glicação avançada
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> ; Célula a apresentadora de antígeno
AVC	Acidente vascular cerebral
CAD	Cetoacidose diabética
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i> ; Ensaio de complicações e controle do diabetes
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos Da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Administração de alimentos e medicamentos
GCK	Glucoquinase
HbA1c	Hemoglobina glicada fração A1C
HHS	<i>Hyperosmolar Hyperglycemic State</i> ; Estado hiperosmolar hiperglicêmico
HLA	<i>Human leukocyte antigens</i> ; Antígeno leucócito humano
HNF1A	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha</i> ; Fator heptonuclear 1- $\alpha$
IAA	Autoanticorpoanti-insulina
ICA	Anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático
Anti-GAD65	Anti-enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65
Anti-IA2	Anti-antígeno 2 do insulinoma
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM	<i>Intercellular adesion molecule</i> ; molécula de adesão intercelular
IDDM	<i>Insulin-dependent diabetes mellitus</i> ; <i>Diabetes mellitus</i> insulino-dependente

IDDM1	<i>Insulin-dependent diabetes mellitus 1</i> ; Diabetes mellitus insulino-dependente 1
IDDM2	<i>Insulin-dependent diabetes mellitus 2</i> ; Diabetes mellitus insulino-dependente 2
IG	<i>Intronless genes</i> ; Genes sem íntron
IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 $\alpha$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i> ; Antígeno 1 associado à função de linfócitos
MAF	<i>Minor allele frequency</i> ; Alelo menos frequente
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> ; Diabetes da maturidade com início no jovem
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i> ; Fator nuclear Kappa B
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> ; Programa Nacional de Normalização da Glicohemoglobina
NK	<i>Natural killer</i> ; Matador natural
NO	<i>Nitric oxide</i> ; óxido nítrico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
Pb	Pares de base
PTM	<i>PostTranslational Modification</i> ; Modificação pós-traducional
PTPN22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, non receptor 22</i> ; Proteína tirosina fosfatase, não receptor 22
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-product</i> ; Receptor para produtos finais de glicação avançada
RMC	Região metropolitana de Curitiba
Rs	<i>Reference sequence</i> ; Sequência referência
SBD	Sociedade brasileira de diabetes
SENPs	<i>Sentrin/SUMO-specific proteases</i> ; Sentrina/SUMO proteases específicas



SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; Polimorfismo de único nucleotídeo
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> ; Pequeno modificador semelhante a ubiquitina
TCR	<i>T cell recptor</i> ; Receptor de célula T
Th1	<i>T helper</i> tipo 1
Th2	<i>T helper</i> tipo 2
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> ; Inibidores teciduais de mateloproteinases
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor- <math>\alpha</math></i> ; Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UEP	Unidade de endócrino pediatria
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UPS	<i>Ubiquitin–proteasome system</i> ; Sistema ubiquitina-proteossoma
Znt8	Anticorpo antitransportador de zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1. Objetivos .....	18
1.1.1. Objetivo geral.....	18
1.1.2. Objetivos específicos.....	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Diabetes mellitus</i> .....	19
2.2. Classificação do <i>Diabetes mellitus</i> .....	21
2.3. Sinais, Sintomas e Complicações .....	24
2.4. Diagnóstico e Biomarcadores de controle glicêmico .....	28
2.5. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1A (DM1).....	32
2.5.1. Fisiopatologia do DM1 .....	34
2.5.2. Marcadores imunológicos do DM1 .....	38
2.5.3. Fatores genéticos .....	42
2.6. Gene <i>MMP-2</i> .....	47
2.7. Gene <i>SUMO4</i> .....	50
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
3.1. Amostras .....	55
3.2. Extração e quantificação do DNA genômico .....	57
3.3. Variabilidades genéticas estudadas .....	57
3.4. Reação em Cadeia da Polimerase/PCR-RFLP .....	57
3.5. Parâmetros bioquímicos.....	62
3.6. Análise Estatística .....	63
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
4.1. Dados antropométricos .....	64
4.1.1. Idade e Gênero.....	65

4.1.2. Peso, Altura, IMC e Z-score .....	65
4.2. Análises bioquímicas.....	65
4.2.1. Biomarcadores de controle glicêmico .....	66
4.2.2. Biomarcadores de perfil lipídico.....	67
4.2.3. Biomarcador de perfil nutricional .....	69
4.2.4. Biomarcador de função renal.....	69
4.2.5. MMP-2 sérica.....	70
4.3. Análises moleculares .....	71
4.3.1. Polimorfismo rs2285053 (-735 C>T) do gene <i>MMP-2</i> .....	71
4.3.2. Polimorfismo rs243865 (-1306 C>T) do gene <i>MMP-2</i> .....	74
4.3.3. Polimorfismo rs237025 do gene <i>SUMO4</i> .....	80
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença heterogênea, complexa e multifatorial que resulta de secreção ou ação insulínica defeituosa levando à hiperglicemia crônica, a qual é extremamente danosa aos órgãos e sistemas, podendo levá-los a uma perda parcial ou total de função (ADA, 2017; SBD, 2018).

Etiologicamente, ele pode ser classificado em duas formas principais: tipo 1, uma destruição autoimune de células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, que reduz a eficiência da produção de insulina, ou, tipo 2, quando a insulina é produzida de forma regular, mas secretada de maneira anormal associada à resistência no desempenho de suas funções fisiológicas (MALECKAS *et al.*, 2015)

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) geralmente ocorre no início da vida, mas pode afetar indivíduos em praticamente qualquer idade. Estudos epidemiológicos estimam uma prevalência de 1 caso em 300 crianças nos Estados Unidos, com um aumento na incidência de 2% a 5% anualmente em todo o mundo (MAAHS *et al.*, 2010). A responsabilidade diária, o gerenciamento clínico e a vigilância necessários para manter as concentrações plasmáticas de glicose dentro dos intervalos de normalidade, para evitar as complicações agudas (episódios hipoglicêmicos e cetoacidose diabética) e as complicações micro e macrovasculares a longo prazo, afetam significativamente a qualidade de vida e os custos públicos de saúde (GROUP *et al.*, 2006; HAMMAN *et al.*, 2014). Dado o impacto expansivo do DM1, os estudos de pesquisa se aceleraram, objetivando melhor entendimento, gerenciamento e possível cura desta condição. Muitos avanços foram feitos nas últimas décadas a esse respeito, mas permanecem questões tais como: o porquê de certas pessoas desenvolverem DM1, mas não outras? Como exemplo a incidência discordante da doença entre gêmeos monozigóticos (GIWA *et al.*, 2020).

A destruição das células produtoras de insulina no pâncreas – pelo sistema imunológico adaptativo –, é promovida por uma interação, não

completamente compreendida, entre a genética de um indivíduo e o meio ambiente no qual está inserido.

Este tipo de diabetes é subordinado a participação de vários genes e a variabilidade genética é um caminho promissor para investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento. Polimorfismos nos genes *MMP-2* e *SUMO4* são potenciais candidatos a investigação de associação com DM1 devido sua influência direta sobre as proteínas codificadas por esses genes, cuja atividade é essencial para manutenção e viabilidade celular e tecidual. Ambas as proteínas têm intrínseca relação com processos fisiológicos e patológicos, como os de quadros inflamatórios e poderiam explicar – pelo menos em partes –, a complexa rede de desdobramentos que antecede o estado hiperglicêmico do distúrbio (YANG, J. *et al.*, 2010; MOHAMMAD; SIDDIQUEI, 2012; SINHA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

O presente estudo objetiva investigar a possível associação entre polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) na região promotora do gene da metaloproteinase de matriz 2/*MMP-2* (rs2285053 e rs243865) e região codificadora do gene da ubiquitina/*SUMO4* (rs237025) com a susceptibilidade ao DM1 e concentrações séricas de biomarcadores como os de controle glicêmico e perfil lipídico.

## 1.1. Objetivos

### 1.1.1. Objetivo geral

Avaliar variações genéticas do tipo SNP nos genes *MMP-2* e *SUMO4* em crianças saudáveis e crianças com *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) e a influência dessa variabilidade sobre parâmetros bioquímicos e antropométricos.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos rs2285053 e rs243865 no gene *MMP-2* em crianças euro-brasileiras saudáveis e crianças com DM1.
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs237025 no gene *SUMO4* em crianças euro-brasileiras saudáveis e crianças com DM1.
- Mensurar biomarcadores bioquímicos (controle glicêmico, perfil lipídico e nutricional e função renal) e *MMP-2* sérica em crianças saudáveis e crianças com DM1.
- Associar as variações genéticas com os biomarcadores bioquímicos e dados antropométricos dos indivíduos em estudo.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Diabetes mellitus*

O *Diabetes mellitus* (DM) – um dos distúrbios crônicos mais comuns no mundo – tem prevalência e significância crescentes na vida da população, além de números alarmantes e projeções preocupantes (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Tal situação está associada ao crescimento e envelhecimento da população, bem como ao seu novo e insalutífero estilo de vida que congrega hábitos sedentários, com redução da prática de atividade física, e má alimentação, resultando em obesidade (SBD, 2018).

Além do ônus individual, na saúde do paciente diabético, o diabetes representa, também, uma sobrecarga direta nos sistemas de saúde, principalmente em países emergentes que ainda lidam com doenças infectocontagiosas e negligenciadas (SBD, 2018). Tópico delicado da situação: diabético requer assistência de uma equipe multiprofissional, que vai desde acompanhamento nutricional até supervisão de profissionais de saúde mental, muitas vezes, não disponível (ADA, 2017).

O custo estimado dos gastos em saúde no diabetes mundialmente ultrapassou a marca de 673 bilhões de dólares no ano de 2015 e deve chegar ao montante de 802 bilhões de dólares em 2040, se as estimativas de crescimento no número de casos se confirmarem. Os gastos globais e regionais com diabetes são aproximadamente 12% do dispêndio total em saúde no mundo, com valor individual na ordem de 1.917 dólares por paciente com diabetes (OGURTSOVA *et al.*, 2017).

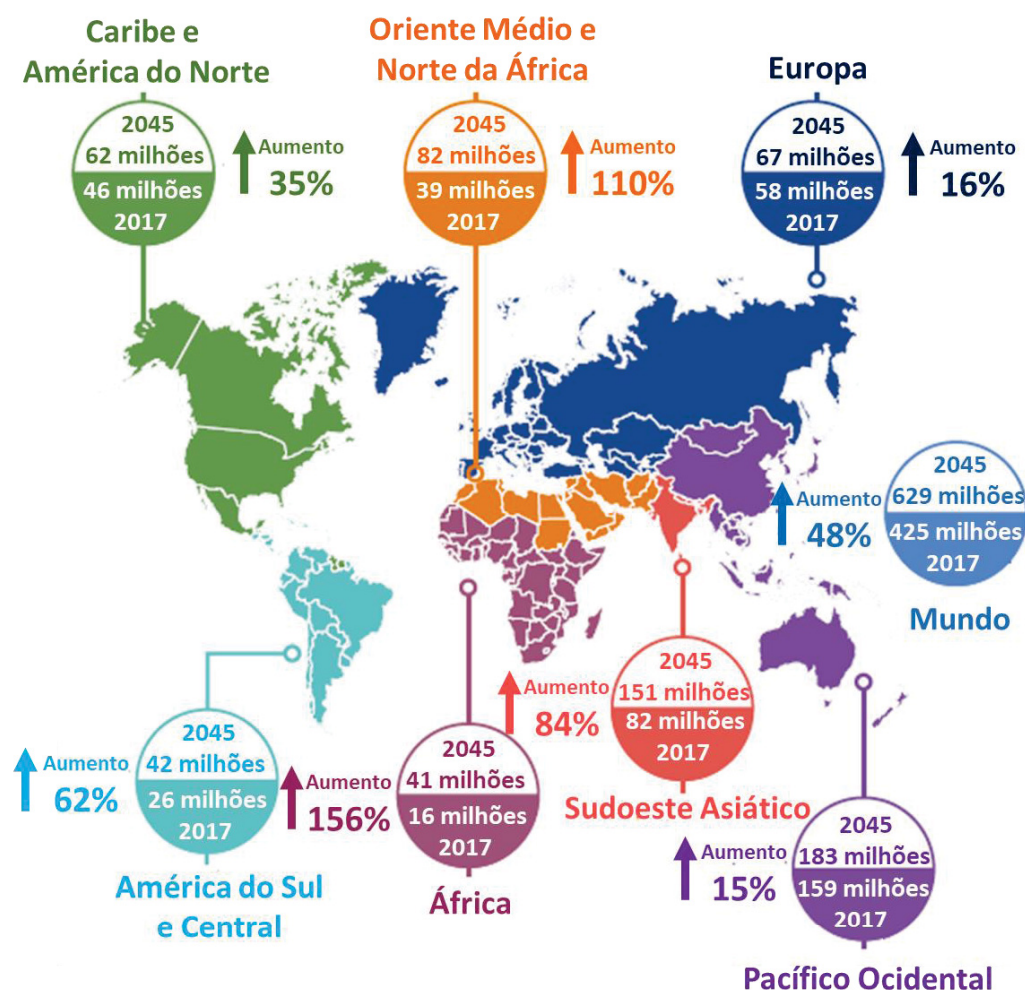
O Brasil, dentre todos os países latino-americanos e caribenhos, se destaca com um gasto estimado que varia de 17,5 a 23,8 bilhões de dólares com o diabetes. O cálculo per capita indica que 1.334 dólares, em média, são desembolsados por brasileiros diabéticos por ano devido à doença e suas complicações. Tais valores – apesar de excessivos –, são subestimados e podem não representar com autenticidade o custo real da doença no país, uma vez que dados com despesas indiretas, como perda de produtividade e deficiências temporárias ou permanentes, não estão integralmente disponíveis

e tendem a sofrer grande variação de uma região para outra (BARCELO *et al.*, 2017).

Os custos exorbitantes são resultado do crítico crescimento no número de novos casos, levando o *Diabetes mellitus* (DM) a ser tratado como epidemia global que já atinge cerca de 8,8% da população mundial (SBD, 2018). Do total de diabéticos, aproximadamente 80% reside em países emergentes com economia em desenvolvimento e há proporção crescente no número de casos em grupos mais jovens (IDF, 2017).

Segundo projeções da Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation* - IDF) em 2045, 629 milhões de pessoas terão diabetes (Figura 1), um aumento acumulado de 48% se comparado aos 425 milhões do ano 2017 (IDF, 2017).

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA E PROJEÇÃO GLOBAL DO DIABETES MELLITUS



Número estimado de diabéticos com idades entre 20 e 79 anos nos anos de 2017 e 2045.

Fonte: Adaptado da Federação Internacional de Diabetes (2017).

## 2.2. Classificação do *Diabetes mellitus*

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (*Amerian Diabetes Association* - ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), a doença pode ser classificada em quatro distintos e abrangentes grupos (ADA, 2017; SBD 2018):

- *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1): desordem autoimune caracterizada por destruição das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas, frequentemente resultando em deficiência absoluta do hormônio insulina (tipo 1A) ou deficiência de insulina por causa idiopática (tipo 1B). Possui diagnóstico limitado e pode ser confundido com outras formas de DM.
- *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2): forma mais prevalente da doença. Associada a uma perda progressiva da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Possui diversos fatores etiológicos e normalmente está associado à obesidade e a hábitos irregulares de alimentação e/ou prática insuficiente de atividade física.
- *Diabetes mellitus* gestacional (DMG): definido como qualquer grau de intolerância à glicose que se manifesta pela primeira vez durante a gestação.
- Outras formas específicas de diabetes podem incluir ainda: defeitos genéticos nas células  $\beta$  e na ação da insulina, distúrbios no pâncreas, endocrinopatias, indução química ou por droga, bem como algumas infecções. Normalmente, essas formas menos frequentes, têm manifestação clínica amplamente variada e são classificadas de acordo com a causa pela qual o metabolismo da glicose não ocorre de maneira eficiente. As bases genéticas são extremamente significativas nessas formas menos comuns, como nos vários tipos do diabetes da maturidade com início no jovem (*Maturity-Onset Diabetes of the Young* - MODY), no diabetes neonatal transitório ou permanente e na associação ocasional com outras síndromes com alicerce genético (Síndrome de Down e Turner).

O DM1 é um subgrupo clássico do diabetes e representa cerca de 5% de todos os casos. A deficiência de insulina torna a administração de um

análogo exógeno indispensável para o controle glicêmico e manutenção da saúde do paciente, podendo ser referido – portanto –, como uma variação do *Diabetes mellitus* cujo tratamento é insulino-dependente (*insulin-dependent diabetes mellitus* – IDDM) (LI, W.; HUANG; GAO, 2017).

Considerada uma doença rara na primeira metade do século XX, o DM1 tem incidência crescente segundo dados internacionais atuais que, apesar de geograficamente limitados, apontam consensualmente um aumento no número de casos em todo o mundo. Nos EUA, a cifra subiu de 19,5 para 21,7 por 100.000 habitantes nos anos de 2002-2003 e 2011-2012, respectivamente, com um crescimento de 1,4% ao ano. Já na Finlândia, país com maior incidência da doença, o total chega a 62,4/100.000. A etiologia do DM1 é variada e resulta, basicamente, da interação entre fatores ambientais e genéticos. Essa interação, contudo, é extremamente heterogênea, resultando em incidências distintas entre populações similares de um mesmo continente (1,5/100.000 na Tanzânia e 10,1/100.000 no Sudão, no continente africano), ou de um mesmo país (4,6/100.000 na Lombardia e 54,4/100.000 na Sardenha, na Itália) (MAYER-DAVIS *et al.*, 2017; NEGRATO *et al.*, 2017).

No DM2, responsável por mais de 90% dos casos de diabetes, é a secreção irregular ou a resistência à insulina que leva à hiperglicemia. A obesidade está fortemente associada ao aumento no número de casos e o tratamento congrega administração de hipoglicemiantes orais, reeducação alimentar e combate ao sedentarismo. É uma forma de diabetes responsável por diversas complicações que, independente de outros fatores de risco cardiovascular, propiciam chance de duas a três vezes maior de infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC), além de duplicar o risco de morte (MALECKAS *et al.*, 2015). A chance de desenvolver DM2 é consideravelmente maior para residentes de países em desenvolvimento e minorias desfavorecidas de estados industrializados e, além do supracitado estilo de vida, a etnia e a genética têm papel preeminente na determinação do risco para a doença. A idade é um ponto pertinente do DM2, pois seu início foi associado à maturidade, apesar das crescentes taxas de incidência entre jovens adultos de 30 a 39 anos. Americanos nativos, hispano, afro e asio-americanos são os grupos mais afetados pelo DM2, em comparação com descendentes europeus, e o histórico familiar é substancial na designação da

predisposição à doença, já que o DM2 é uma condição herdada, com mais de 100% de concordância entre gêmeos idênticos (FLETCHER; GULANICK; LAMENDOLA, 2002).

No *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), distúrbio metabólico mais comum da gravidez, a hiperglicemia se desenvolve no segundo ou terceiro trimestre da gestação e tanto mãe quanto filho tem chances elevadas de desenvolverem complicações. Aumento de peso e avanço da idade materna são apontados como fatores para crescimento das taxas do DMG que, se não controlado, pode evoluir para um quadro de DM2 (CHIEFARI *et al.*, 2017). O DMG provoca imoderado crescimento fetal, complicações no parto e risco de morte à parturiente. Em muitos casos a cesariana se torna a única opção viável e o bebê pode sofrer lesões durante o parto, dado seu tamanho anormal. A gestante diabética tem risco aumentado para distúrbios cardiovasculares e sua prole maior chance de desenvolver diabetes ou se tornar obesa (ALFADHLI, 2015).

Entre as formas menos comuns de diabetes, o diabetes da maturidade com início no jovem (*Maturity-Onset Diabetes of the Young* - MODY) é uma das mais relevantes e constitui de 1 a 2% de todos os casos de DM. É um distúrbio heterogêneo em termos clínicos e genéticos e frequentemente é diagnosticado como DM1 ou DM2. Seu início é precoce, geralmente antes dos 25 anos. A doença é uma forma monogênica de diabetes, compromete – em diferentes graus –, as células  $\beta$  e pode ser categorizada em 13 subtipos, que se diferenciam entre si pela idade de surgimento, quadro hiperglicêmico e responsividade ao tratamento (SBD, 2016, 2018). MODY apresenta herança autossômica dominante que provoca defeitos genéticos nas células produtoras de insulina por meio de mutações em genes como da glucoquinase (GCK) e do fator nuclear dos hepatócitos 1 alfa (*Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha* - HNF1A). Alguns tipos de MODY têm características clínicas específicas que auxiliam no diagnóstico, mas a investigação genética é imprescindível para determinar o tratamento preciso com base na etiologia. Este tipo de DM é particularmente suspeito em indivíduos magros, não pertencentes a grupos étnicos com alta prevalência de DM2 e sem auto-anticorpos, os marcadores característicos de DM1. A terapêutica inclui assistência ao paciente e geralmente não requer manejo farmacológico (KLEINBERGER; POLLIN, 2015).

### 2.3. Sinais, Sintomas e Complicações

Os sinais e sintomas frequentemente associados a quadros de hiperglicemia, dos mais comuns aos mais raros, são: poliúria (micção excessiva), polidipsia (sede excessiva), perda de peso, polifagia (fome excessiva), visão turva, cansaço, dificuldade na cicatrização de feridas, desinteresse em atividades rotineiras e falta de concentração, sensação de formigamento ou dormência nos membros e extremidades como mãos e pés e infecções frequentes (IDF, 2017; SBD 2018).

O inadequado controle das concentrações plasmáticas de glicose, somado à baixa frequência de atividade física, hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão e longos períodos de convívio com a doença (aproximadamente 10 anos) são fatores preditivos para complicações macro e microvasculares em diabéticos. Tais complicações são responsáveis pelos agravos em saúde associados ao diabetes e pelo aumento da morbimortalidade e incapacitação temporária ou permanente desses indivíduos (PAPATHEODOROU *et al.*, 2016).

A cronicidade do estado hiperglicêmico gera dano progressivo ao endotélio vascular que se reflete sob a forma de complicações nas terminações nervosas, retina e glomérulos renais, além de degeneração em sistemas primordiais como cérebro e coração (LEE, J. Y. *et al.*, 2019).

Ao contrário de outros tipos celulares, que regulam negativamente sua captação de glicose quando as concentrações extracelulares são elevadas, as células vasculares não o fazem, levando a um quadro de hiperglicemia intracelular, e por isso tornam-se as células mais afetadas. Este é o ponto de partida para os mecanismos que promovem o dano vascular por hiperglicemia, que apesar de numerosos, são orquestrados por um único evento em comum: a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

Em condições fisiológicas, a produção e eliminação das ERO – substâncias altamente reativas, geradas a partir da reação de redução do oxigênio – estão em equilíbrio, objetivando inibir respostas acentuadas de proteção ou dano à célula. Elas atuam como sinalizadoras pró e anti-



sobrevivência, com remoção de sistemas biológicos danificados ou prejuízo oxidativo indesejável, respectivamente. Quando a produção e eliminação não são reguladas, as concentrações de ERO se tornam supranormais, provocando estresse oxidativo. Uma vez que esse estresse não é compensado por um mecanismo de controle por retroalimentação negativa, o tecido pode sofrer perda indesejada de função, devido ao dano causado às organelas celulares, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (DA SILVA; GONÇALVES, 2010; ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2014).

Como consequência do estresse oxidativo, há severa redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (*Nitric Oxide*- NO), devido à reação com o ânion superóxido para formação de peroxinitrito. O NO é um radical livre liberado pela célula endotelial que exerce função vasoprotetora. Ele é responsável pela manutenção do tônus vascular, por meio de vasodilatação, regula a pressão sanguínea, previne agregação plaquetária e inibe adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Quando diminuído, favorece distúrbios tromboembólicos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; SCHAAN; SILVA; IRIGOYEN, 2010).

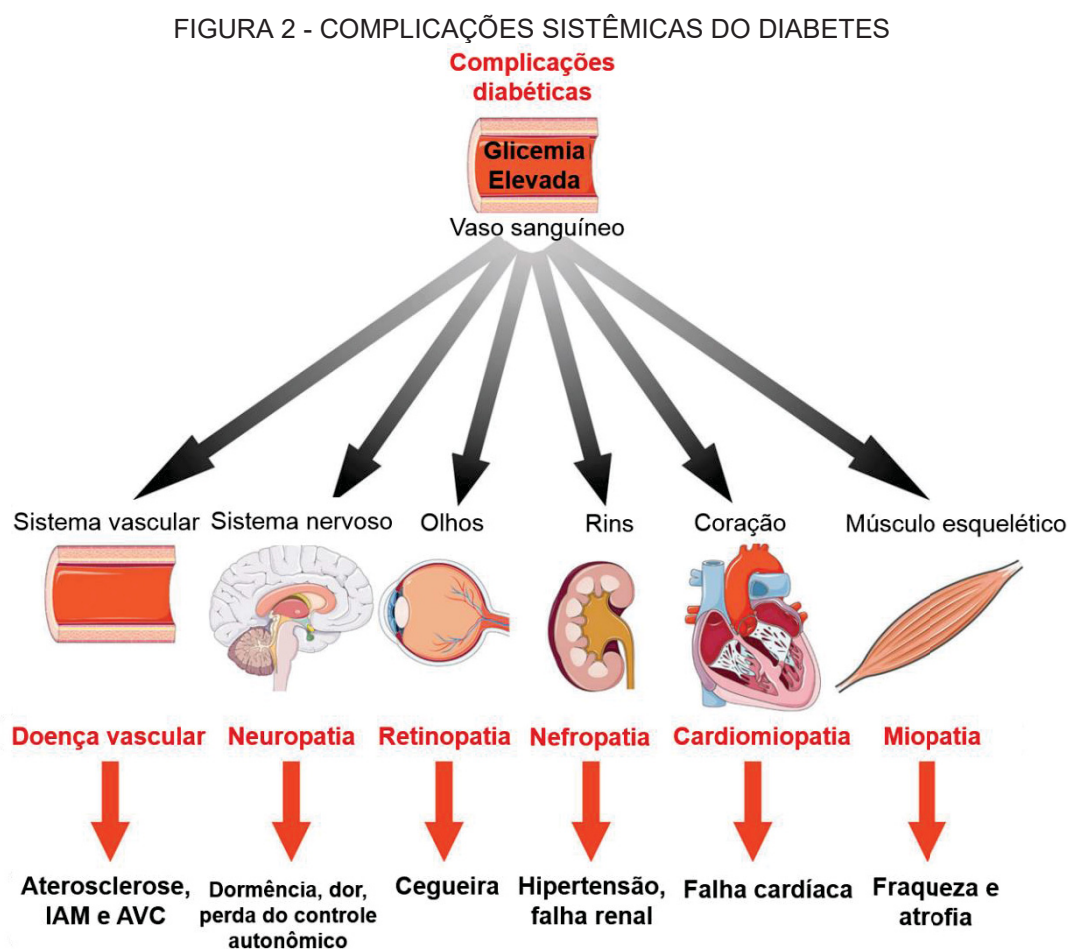
Outra consequência do estresse oxidativo é o aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End-Products*- AGEs) e na expressão de receptores de produtos finais de glicação avançada (*Receptor for Advanced Glycation End-product*-RAGEs) (BROWNLEE, 2005).

Os AGEs são, vertiginosamente formados na hiperglicemia resultante do diabetes, por meio de reação não enzimática entre açúcares redutores como a glicose e grupamentos amino das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, em um processo conhecido como reação de *Maillard* (SINGH, R. E. A., 2001; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Depois de formados, os AGEs causam danos no microambiente celular por três vias principais: alteração da função de proteínas intracelulares, interação irregular de componentes da matriz extracelular com receptores de superfície celular e ligação de proteínas plasmáticas modificadas com receptores de AGEs culminando na indução de fatores de transcrição associados às condições patológicas (GOLDIN *et al.*, 2006). Além disso, a interação AGE-RAGE ativa mecanismos intra e extracelulares e propicia processos pró-coagulantes e pró-inflamatórios, com aumento da expressão de

genes, tais como os da interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  - TNF- $\alpha$ ) (SCHMIDT, 1994; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Os danos vasculares (Figura 2) resultantes da produção acentuada de ERO e, consequente redução de NO e aumento de AGEs, levam a quadros de cegueira, falha renal, neuropatia, além de distúrbios cardiovasculares e cerebrovasculares, como infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC) (PAPATHEODOROU *et al.*, 2016; LEE, J. Y. *et al.*, 2019).



O *Diabetes mellitus* aumenta o risco de doença arterial coronariana, podendo bloquear o fluxo sanguíneo e causar ataque cardíaco e/ou derrame. A hiperglicemia causa danos às fibras nervosas, causando neuropatias que podem afetar o trato digestivo, o trato urinário, coração e vasos sanguíneos. A retinopatia é a principal causa de cegueira em adultos diabéticos no mundo e quase metade dos pacientes diabéticos desenvolve nefropatia. Na maioria dos casos, os pacientes desenvolvem insuficiência renal, requerendo diálise. Em condições diabéticas, a estrutura e a função muscular do coração são prejudicadas, levando à cardiomiopatia. O diabetes também afeta a função muscular esquelética, causando fraqueza e atrofia muscular.

Fonte: Adaptado Nutter e Kuyumcu-Martinez (2018).

O *Diabetes mellitus*, além das complicações crônicas, também resulta em complicações agudas e de alto risco à vida do paciente, como a cetoacidose diabética (CAD) e o estado hiperosmolar hiperglicêmico (*Hyperosmolar Hyperglycemic State* - HHS). Elas são pontos diametralmente opostos no espectro dos danos por descompensação do controle glicêmico e estão associadas à alta taxa de mortalidade do paciente diabético. Em ambas, o desequilíbrio metabólico latente, resulta de uma ausência absoluta ou relativa redução das concentrações plasmáticas de insulina, com consequente aumento na quantidade dos hormônios contrarreguladores (CHIASSON *et al.*, 2003).

A carência de insulina repercute na produção hepática de glicose, através do aumento da glicogenólise e gliconeogênese, por estímulo das concentrações elevadas de hormônios, tais como glucagon, catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento. Há ainda, redução na captação de glicose pelos tecidos periféricos e estímulo da lipase hormônio sensível, que passa a converter triglicerídeos em ácidos graxos livres, de forma acelerada. No fígado, os ácidos graxos livres são oxidados em corpos cetônicos, num processo exortado pelo glucagon, que gera redução do bicarbonato e leva à acidose metabólica (CHIASSON *et al.*, 2003; FAYFMAN; PASQUEL; UMPIERREZ, 2017).

A acidose metabólica, somada à hiperglicemia, gera diurese osmótica, por depleção intracelular de água, com subsequente hipovolemia e redução da taxa de filtração glomerular. Como resultado, os níveis de depuração da glicose são particularmente reduzidos, levando a uma piora no – já crítico – quadro hiperglicêmico (UMPIERREZ; KORYTKOWSKI, 2016; STONER, 2017).

Os sinais comumente associados à CAD e HHS vão de náusea e vômito à queda de apetite e debilidade mental, com subsequente apatia e desinteresse nas relações interpessoais. Essas condições, apesar de compartilharem o mesmo esteio – o estado de hiperglicemia – podem ser diferidas por dois pontos pertinentes: a cetoacidose e a desidratação. Na CAD, a acidose metabólica é consideravelmente maior, uma vez que há deficiência profunda ou absoluta de insulina. Ela é frequentemente associada ao DM1 e ocorre num período de 12 a 48 horas. Já no HHS, condição frequentemente associada a idosos e ao DM2, é a desidratação o ponto de distinção, uma vez

que ela é notadamente elevada e gera grave hipotensão. As concentrações de insulina são ligeiramente superiores, se comparados as da CAD, o que inibe aumento dos hormônios contrarreguladores, de ácidos graxos livres e a produção de corpos cetônicos pelo fígado. Sua manifestação é insidiosa e o risco ao paciente aumenta quando a ingestão de líquidos é insuficiente (SCHNURE; LEAHY, 2013; KARSLIOGLU FRENCH; DONIHI; KORYTKOWSKI, 2019).

#### 2.4. Diagnóstico e Biomarcadores de controle glicêmico

O diagnóstico precoce do DM auxilia na adoção de medidas terapêuticas que contribuem para redução do impacto e controle da glicemia, bem como no manejo do quadro clínico de pacientes com tolerância reduzida à glicose. Ele é baseado nas alterações das concentrações plasmáticas de glicose em diferentes situações – jejum, ao acaso, após sobrecarga – e na aferição da hemoglobina glicada (Quadro 1) (GROSS *et al.*, 2002; SBD, 2018).

##### QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS*

Glicemia ao acaso  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L). Deve ser realizada em pacientes com sintomas clássicos ou em crise hiperglicêmica;

Ou

Glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose por via oral  $\geq 200$  mg/dL (11,1 mmol/L). O paciente não deve fazer alterações alimentares no período que precede o exame;\*

Ou

Glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dL (7,0 mmol/L). O jejum deve ocorrer num período mínimo de pelo menos 8 horas;\*

Ou

HbA1c  $\geq 6,5\%$  (48mmol/mol). O teste deve ser realizado pelo método padronizado e certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e nos padrões da *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT).\*

\*Com glicemia inequívoca ausente. Os resultados devem ser confirmados com repetição dos testes.

Fonte: Adaptado da Associação Americana de Diabetes (2020)

Existem prós e contras nestes quatro diferentes métodos de diagnóstico. A glicemia em jejum  $\geq 140$  mg/dL é um teste altamente específico, mas insensível para o diagnóstico de DM (TAYLOR; ZIMMET, 1981). Quase todos os indivíduos com glicemia em jejum  $\geq 140$  mg/dL tem glicemia 2 horas após

sobrecarga de 75 g de glicose  $\geq 200$  mg/dL, mas uma parcela significativa de indivíduos (dependendo da população) com glicemia 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose  $\geq 200$  mg/dL não terá glicemia de jejum  $\geq 140$  mg/dL. O teste A1c mede a glicação de proteínas e pode potencialmente indicar hiperglicemia crônica, mas esse teste não prova diretamente concentrações elevadas de glicose no sangue - a definição clínica de DM (BONORA; TUOMILEHTO, 2011). Além disso, medir glicemia 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose no teste de tolerância oral à glicose é um método mais preciso do que medir a glicemia em jejum e A1c no diagnóstico de DM (KIM, D. L. *et al.*, 2016). No entanto, a glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose também pode indicar tolerância à glicose diminuída, em vez de diabetes. Portanto, recomenda-se que mais de um teste seja usado no diagnóstico de DM.

Geralmente, glicemia em jejum, glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose e A1c são igualmente apropriados para triagem de diagnóstico. Mas deve-se observar que os testes não necessariamente detectam diabetes nos mesmos indivíduos. As intervenções para a prevenção primária do diabetes tipo 2 (TUOMILEHTO *et al.*, 2001; KNOWLER *et al.*, 2002) têm se mostrado eficientes entre indivíduos que apresentam intolerância à glicose com ou sem glicemia de jejum elevada, mas ineficiente entre indivíduos com isolada intolerância à glicose ou classificados como pré-diabéticos utilizando o teste da A1c (ADA, 2020).

A glicemia em jejum e glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose podem ser utilizadas para o diagnóstico de diabetes (Quadro 1). A concordância entre os dois testes é imperfeita, como a concordância da A1c e outros testes baseados na glicose. Comparado à glicemia de jejum e A1c, a glicemia 2 horas após sobrecarga detecta mais indivíduos com diabetes e pré-diabetes (MEIJNIKMAN *et al.*, 2017).

A hemoglobina glicada fração A1c (HbA1c) é o componente mais importante do conjunto da hemoglobina glicada que resulta de uma reação não-enzimática e irreversível entre a hemoglobina A e alguns açúcares num processo dependente do tempo e da concentração de glicose. Sua dosagem é parâmetro essencial na avaliação do controle glicêmico e reflete o valor médio da glicose nos dois ou três meses anteriores à realização do teste (KOJIC DAMJANOV; DERIC; EREMIC KOJIC, 2014; SBD, 2016).

A reação ocorre devido à alta permeabilidade do eritrócito à glicose, que expõe a hemoglobina a uma concentração do açúcar parecida com a do meio extracelular. A glicação, principalmente da fração A1c, gera a ligação de uma molécula de glicose ao grupo amino terminal da hemoglobina A e a estrutura de HbA1c resultante deste processo permanece dentro da célula e indica a concentração média de glicose no sangue. O exame fornece dados da glicemia num período de 60 a 90 dias e é necessário levar em consideração que as concentrações mais recentes da glicose são as mais influentes na glicação da hemoglobina, já que 50% da HbA1c é formado no mês anterior ao da coleta e os outros 50% são divididos em 25% para cada mês precedente (SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

A A1c apresenta várias vantagens quando comparada com a glicemia de jejum e a glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose, incluindo maior conveniência (não é necessário jejum), maior estabilidade pré-analítica, e menor alteração em diferentes dias devido ao estresse, dieta ou doenças. Contudo, estas vantagens podem ser compensadas pela menor sensibilidade da A1c no ponto de corte designado, maior custo, disponibilidade limitada de testes de A1C em certas regiões do mundo e a correlação imperfeita entre A1C e glicose média em certos indivíduos. Com o valor de corte de 6,5% de A1c, apenas 30% dos indivíduos são diagnosticados com DM em ambos os testes (glicemia de jejum e glicemia 2 horas após sobrecarga de glicose), de acordo com os dados da pesquisa nacional sobre exames de saúde e nutrição (*National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES*) (COWIE *et al.*, 2010). Ao se utilizara A1c para diagnosticar diabetes, é importante reconhecer que ela é uma medida indireta das concentrações plasmáticas médias e levar outros fatores em consideração que podem afetar a glicação da hemoglobina independente da glicemia, tais como hemodiálise, gravidez, tratamento do HIV (KIM, P. S. *et al.*, 2009; ECKHARDT *et al.*, 2012), idade, raça/etnia, estágio da gravidez, origem genética, além de anemia/hemoglobinopatias (ADA, 2020).

Assim, os biomarcadores utilizados correntemente para o diagnóstico do DM possuem limitações. Além disso, estes biomarcadores clássicos são úteis apenas após o estabelecimento da doença e falham na sua predição, durante a condição pré-diabética. Prognóstico e predição populacional de maior risco, requerem a identificação de marcadores específicos que sejam sensíveis para



detectar os estágios iniciais da doença. Biomarcadores que pudessem prever o risco de DM seriam úteis para o desenvolvimento de terapias preventivas e proativas para indivíduos que se encontram em alto risco de desenvolvimento do DM (VAISHYA; SARWADE; SESHADRI, 2018).

O monitoramento da glicemia é primariamente acessado pela A1c, a qual foi a dosagem realizada nos estudos clínicos que demonstraram os benefícios da melhora do controle glicêmico (ADA, 2020). Outros exames podem ser utilizados no acompanhamento do DM, alguns deles de forma análoga à A1c, ou seja, como estimativas da glicemia média por determinado período de tempo. Nenhum desses exames, entretanto, é validado para o diagnóstico de DM. Além disso, exames como glicemia pós-prandial, frutossamina, 1,5-anidroglicitol (1,5-AG) e albumina glicada pretendem acrescentar informação à estimativa da glicemia média e/ou mensurar a variabilidade glicêmica. Esse conceito tem ganhado força no que diz respeito à modulação do risco cardiovascular no DM (CERIELLO *et al.*, 2008), mas, por enquanto, não tem aplicabilidade no diagnóstico da doença.

O 1,5-anidroglicitol (1,5-AG) é um monossacarídeo estruturalmente semelhante à glicose, derivado principalmente da alimentação, que sofre absorção no intestino e reabsorção nos túbulos renais, com a finalidade de manter um quadro metabólico estável. Sua concentração sérica é negativamente relacionada à glicemia e sua aplicação clínica, como marcador preditivo de complicações do diabetes, foi aprovada em 2003 pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA (YING *et al.*, 2018).

As concentrações de 1,5-AG, advindos da alimentação, são equilibrados através da excreção urinária e aproximadamente 99% é reabsorvido nos rins. Quando há aumento da glicose circulante, em concentrações que ultrapassam o limiar renal para glicosúria, essa reabsorção é competitivamente inibida, por dependerem dos mesmos transportadores, e o 1,5-AG acaba sendo excretado na urina, gerando rápida redução de suas concentrações séricas (DUNGAN, 2008).

Indivíduos diabéticos exibem concentrações de 1,5-AG consideravelmente menores, quando comparados a indivíduos normoglicêmicos, e a medição desse marcador – devido à sua fácil associação com estado hiperglicêmico – é crucial para estimar as excursões glicêmicas

pós-prandiais e em curto prazo, 1 ou 2 semanas (KOGA, 2014; MA *et al.*, 2015).

Frutosamina designa a glicação de proteínas séricas totais, especialmente a albumina, e atua com alternativa à dosagem de HbA1c cuja exatidão possa ter sido prejudicada por interferentes que reduziram sua confiabilidade, como anemias e hemoglobinopatias. É um biomarcador que, devido a ampla rotatividade das proteínas, reflete o controle glicêmico de curto prazo – normalmente das duas semanas anteriores ao exame – e é frequentemente empregado na avaliação da efetividade do tratamento com agentes farmacológicos ou insulina (SBD, 2016; TAVARES RIBEIRO; PAULA MACEDO; FILIPE RAPOSO, 2016).

A dosagem da frutosamina é rápida, precisa, econômica e metodologicamente acessível. O exame pode se somar a outros testes de controle glicêmico e corroborar observações clínicas prévias, embora algumas associações com complicações crônicas do DM ainda não estejam tão bem estabelecidas quanto para a fração A1c da hemoglobina glicada. Sua aplicação é promissora na investigação de alterações rápidas no metabolismo da glicose, em excursões glicêmicas maiores e como marcador de exposição e risco da doença, mas não é consensual no DMG e é limitada em condições que suscitem perda proteica, como síndrome nefrótica, cirrose hepática e distúrbios da tireoide (DANESE *et al.*, 2015; SBD, 2016; TAVARES RIBEIRO; PAULA MACEDO; FILIPE RAPOSO, 2016).

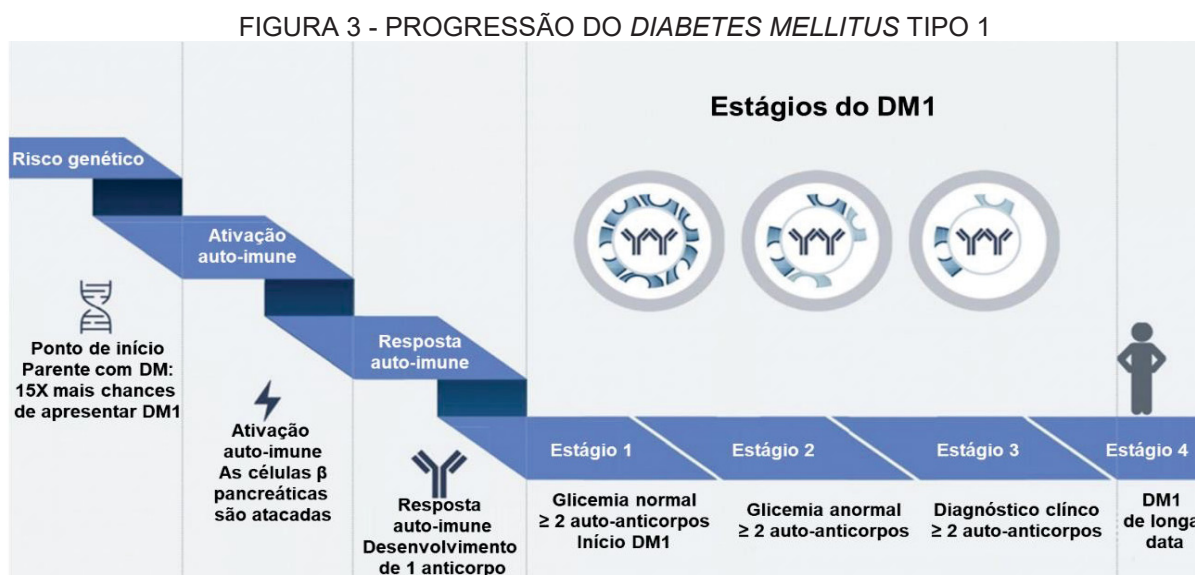
## 2.5. *Diabetes mellitus* tipo 1A (DM1)

Anteriormente concebida como uma mazela restrita a indivíduos com pouca idade, como crianças e adolescentes, o *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é, atualmente, considerado uma doença crônica não limitada à juventude e de grande impacto à vida do portador. O distúrbio tem forte alicerce imunológico, pois se origina de processo autoimune que leva a morte de células endócrinas do pâncreas, mas nem todos os diabéticos do tipo 1 exibem características dessa contribuição imune (como auto-anticorpos e marcadores genéticos). Por esse motivo, foi reclassificado em dois subgrupos: 1A autoimune e 1B idiopático. Ao contrário de outras desordens autoimunes, o DM1 é

discretamente mais comum em meninos e homens e pode ser influenciado por mudanças sazonais. Seu desenvolvimento é extremamente heterogêneo e suas características patogênicas, genéticas e fenotípicas, acentuadamente variadas (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

O desenvolvimento do DM1 pode ser didaticamente dividido em estágios que compreendem desde a predisposição genética para o tipo 1A da doença até a perda total da massa de células  $\beta$  e, conseqüentemente, ausência absoluta de insulina. A predisposição vem de genes ligados à resposta imune, como HLA, polimorfismos no gene da insulina e de diversos outros genes com implicações menores na fisiopatogenia do DM1 e, apesar de formas monogênicas raras, o distúrbio é classicamente definido como poligênico (EISENBARTH, G. S; JEFFREY, 2008).

O risco genético gera vários desdobramentos imunológicos e a doença progride para os estágios finais de seu curso. No estágio 1, dois ou mais auto-anticorpos estão presentes e o paciente ainda está em condição normoglicêmica. O estágio 2 corresponde a transição da normoglicemia para a disglucemia, em um contexto de auto-imunidade em curso. O estágio 3 denota o diagnóstico clínico do DM1, o qual é frequentemente, mas não sempre, acompanhado de sintomas (Figura 3).



Estágios do desenvolvimento do *Diabetes mellitus* tipo 1

Fonte: Adaptado Bingley e colaboradores (2018).

Esse sistema de estágios destaca a natureza progressiva do DM1 e o fato de a doença estar presente muito antes da apresentação clínica, além de enfatizar que seu início pode ser definido por um "ponto sem retorno", com a detecção de dois ou mais auto-anticorpos. Ensaio clínico em uma população com múltiplos auto-anticorpos estão assim tratando uma doença estabelecida: doença de auto-imunidade das ilhotas. O tratamento da autoimunidade das ilhotas, portanto, não equivale ao conceito de intervir em pessoas saudáveis com intuito de prevenção (BINGLEY *et al.*, 2018).

### 2.5.1. Fisiopatologia do DM1

O DM1 é resultado de uma resposta autoimune dirigida contra antígenos das células  $\beta$  pancreáticas, em um processo mediado por linfócitos T, e consequente comprometimento da secreção da insulina (HANDWERGER; FERNANDES; BROWN, 1980). Além dos linfócitos T, as células *natural killer* (NK) e os macrófagos podem estar implicados no processo de destruição das células nas ilhotas pancreáticas, denominado insulite, que parece ocorrer com maior intensidade nas células que são metabolicamente ativas, ou seja, as que secretam insulina (NUNES, 2017).

O processo de autoimunidade se instaura a partir da oscilação no padrão de reconhecimento de antígenos próprios e consequente redução da tolerância a eles (SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

A agressão característica da insulite é um processo de lento desenvolvimento com uma fase pré-clínica que pode durar anos e, quando manifesta, já provocou severa ou absoluta redução das células beta e hiperglicemia. As células inflamatórias envolvidas na insulite migram para o sítio inflamatório através de moléculas de adesão, cuja expressão pode estar aumentada dada a resposta imune em curso, como as integrinas antígeno 1 associado à função do linfócito (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1* – LFA-1) presentes na superfície dos linfócitos e as moléculas de adesão intercelular (*InterCellular Adesion Molecule* – ICAMs) encontradas na superfície das células endoteliais. Os linfócitos T  $CD4^+$  (auxiliar) e  $CD8^+$  (citotóxico), reconhecem antígenos apresentados pelos MHC (complexo de histocompatibilidade humana) de classes I e II, respectivamente, e direcionam

a inflamação de acordo com suas funções. As células T CD8<sup>+</sup> mediam a destruição das células “afetadas”, e as células T CD4<sup>+</sup> produzem citocinas com o objetivo de promover proliferação e diferenciação de efetores adaptativos como linfócitos T e B, e inatos como macrófagos (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999).

As citocinas secretadas durante a inflamação podem seguir um padrão denominado Th1 (*T helper* tipo 1) ou Th2 (*T helper* tipo 2), que determina se a resposta imune vai ser mediada por participação celular ou por indução da produção de anticorpos. Estes padrões, antes de se estabelecerem, são precedidos por uma fase conhecida como Th0 na qual a interação com a APC (célula apresentadora de antígenos) e com o microambiente local determina para qual padrão a resposta imune vai se direcionar. Th1 e Th2 se antagonizam com inibição mútua e as citocinas liberadas em um deles inibem a resposta do outro. Th1 compreende, principalmente, a atuação da interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (INF- $\gamma$ ), durante o desenvolvimento do DM1. A IL-2 exerce influência sobre diversos tipos celulares, sendo a mais relevante a exercida sobre linfócitos T por proporcionar proliferação e expansão das T regulatórias que inibem outras células T auto-reativas. Portanto, uma IL-2 diminuída leva a uma menor regulação das células com baixa tolerância a antígenos próprios. Já o IFN- $\gamma$  atua no fenótipo e função das células beta tornando-as alvos melhores e os linfócitos T mais responsivos (NUNES, 2017).

A atuação da IL-2, no perfil Th1, apesar de paradoxal, pode ser explicada pela observação do processo inflamatório ao qual a linhagem NOD (*Non Obese Diabetic*) é submetida. Nele, o acúmulo de células T auto-reativas gera uma redução das concentrações dessa interleucina, formando um ciclo onde as células T regulatórias são menos reguladas e desempenham com menor eficiência sua função (KIRSTEN; SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2010).

Por outro lado, o perfil Th2 exibe sutil característica protetora no DM1 e secreta as interleucinas 4,6 e 10 (IL-4, IL-6, IL-10). IL-4 é produzida por diversas células do sistema imune, principalmente as T auxiliares, e é a principal envolvida na ativação da via Th2. Ela protege contra autoimunidade impedindo a resposta padrão Th1 e diminuindo a apresentação de auto-antígenos. A IL-6 atua na diferenciação de linfócitos T e B e possui papel no desenvolvimento do DM, mesmo sendo uma citocina Th2. IL-10 inibe

macrófagos e células dendríticas, regulando – portanto –, as reações imunes mediadas por células, mas se associada à citocinas Th1, pode acentuar o quadro inflamatório característico do DM1 (NUNES, 2017).

Além da imunidade celular, os linfócitos B também podem estar implicados na insulite e, se detectada sua presença em grandes quantidades, podem servir como marcadores precoces da autoimunidade latente ou de rápida taxa de perda das células. A insulite provoca, ainda, acúmulo de ácido hialurônico, um constituinte da matriz extracelular, e suas proteínas de ligação. Os indícios são de que o ácido hialurônico auxilia na adesão e migração das células inflamatórias e, em modelos experimentais, a limitação da deposição dessa molécula foi promissora na prevenção do diabetes (PUGLIESE, 2016).

A progressão da insulite leva à redução da massa de células beta e consequente aumento das concentrações de glicose circulante, estabelecendo o quadro diabético (CLARK; KROGER; TISCH, 2017).

Resumidamente, para o desenvolvimento do DM1, tanto em humanos como em ratos, primeiramente uma resposta imune tem que ser desencadeada contra antígenos das células  $\beta$ . Segundo, para que haja a destruição das células  $\beta$ , a resposta precisa desenvolver uma forte característica pró-inflamatória. Terceiro, o controle regulatório da resposta de auto-imunidade precisar ser ineficiente para permitir que a resposta se torne crônica e destrua as células  $\beta$  (Figura 4).

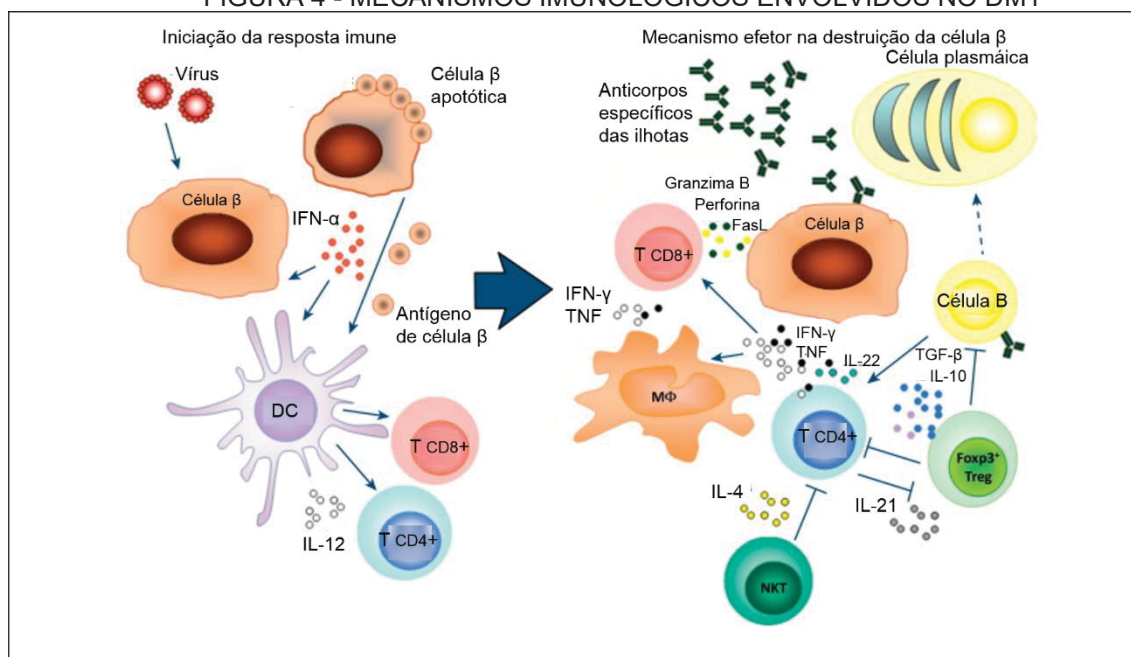
Esforços consideráveis têm sido feitos para a identificação dos mecanismos que causam destruição das células  $\beta$ , porque a sua compreensão poderia ser o primeiro passo para conceber uma cura para o DM1 (WALLBERG; COOKE, 2013).

Sabe-se que vírus, por exemplo, coxsackie B, rubéola, caxumba, pode infectar diretamente e lisar as células  $\beta$ , mas infecções virais também podem contribuir indiretamente através do aumento da expressão do MHC de classe I em células  $\beta$  e da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interferons do tipo I (VON HERRATH, 2009). Exposição às citocinas pró-inflamatórias têm efeitos nas próprias células  $\beta$ , levando a um aumento da expressão de quimiocinas, como IL-8 e ligante 5 de CC quimiocina (*Chemokine (C-C motif) Ligand 5* - CCL5/RANTES) (EIZIRIK *et al.*, 2012).



Um estudo recente mostra que mais de 50% dos 41 genes atualmente identificados como associados ao aumento do risco de desenvolver DM1, são expressos em ilhotas humanas e que a expressão de vários desses genes é ativada por estímulos pró-inflamatórios, indicando a possibilidade de que as próprias células  $\beta$  contribuam para a sua morte através da interação com o sistema imunológico (EIZIRIK *et al.*, 2012).

FIGURA 4 - MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO DM1



A morte celular nas ilhotas pode ocorrer fisiologicamente ou como resultado de uma infecção. As células dendríticas (DCs) estão sempre presentes nas ilhotas e podem capturar os antígenos liberados pelas células  $\beta$ . A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interferons do tipo I (IFNs), como resultado de infecção por vírus ou resposta ao estresse, pode alterar a responsividade das células  $\beta$  às ações das citocinas produzidas pelas células T, como a interleucina 22 (IL-22). Os IFNs do tipo I também ativam as DCs e promovem a apresentação de antígenos das células  $\beta$  para as células T. As DCs podem ativar células T CD4<sup>+</sup>, as quais promovem morte mediada por macrófagos através da produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio. As células T CD4<sup>+</sup> também podem ativar células B específicas para antígenos das ilhotas, para que possam se diferenciar em células plasmáticas produtoras de anticorpos. Os anticorpos podem ligar às células  $\beta$  e mediar morte pelo sistema complemento ou por ligação aos receptores Fc nos macrófagos, e as células B ativadas podem funcionar como células apresentadoras de antígenos, aumentando ainda mais a resposta imune contra as células  $\beta$ . Interação com as células T CD4<sup>+</sup> específica para antígenos das células  $\beta$  e a presença de citocinas pró-inflamatórias podem permitir que as DCs façam apresentação cruzada para as células T CD8<sup>+</sup> específicas para antígeno das células  $\beta$  para que elas possam regular positivamente suas propriedades citotóxicas. Essas células T CD8<sup>+</sup> citolíticas (CTLs) podem matar as células  $\beta$  através da liberação de grânulos citolíticos contendo perforina e granzimas, bem como através da interação Fas – FasL. Esses mecanismos imunológicos podem ser atenuados por subconjuntos de células reguladoras, tais como células natural killers produtoras de IL-4 e células T regulatórias Foxp3<sup>+</sup> (Fox). No entanto, as células T reg podem estar incapacitadas na presença de certas citocinas, como a IL-21, a qual libera o sistema imunológico destrutivo das células  $\beta$  da regulação. Abreviações: MF, macrófago; TGF, fator de crescimento e transformação; TNF, fator de necrose tumoral.

Fonte: Adaptado de Wallberg e Cooke (2013).

Foi mostrado que células T de pacientes com início recente de DM1 expressam IL-22 (ARIF *et al.*, 2011) e que as células das ilhotas expressam o receptor para IL-22, que normalmente sinaliza através do transdutor sinal e ativador de transcrição 3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3* - STAT3), que regula positivamente a transcrição de genes protetores (SINGH, B.*et al.*, 2011). No entanto, a exposição das células  $\beta$  ao IFN- $\alpha$  faz com que o receptor da IL-22 mude para a sinalização através da STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), que induz a regulação positiva da expressão de proteínas de danos tecidual induzíveis por óxido nítrico sintetase (*NO Sintetase induzível* - iNOS) (BACHMANN *et al.*, 2013). O bloqueio do TNF- $\alpha$  no início do desenvolvimento da doença anula o seu progresso em ratos NOD, mesmo na ausência de uma infecção (LI, Q.; MCDEVITT, 2011). A morte das células  $\beta$  induzida por vírus ou fisiológica (DUVILLIE *et al.*, 2002; TURLEY *et al.*, 2003), resulta na liberação de antígenos, e as células dendríticas presentes nas ilhotas não inflamadas de ratos ou humanos captam esses antígenos e os apresentam (CALDERON; UNANUE, 2012). Obviamente, para que ocorra uma resposta imune, as células T precisam reconhecer os antígenos apresentados, e isso só pode acontecer se as células T que reconhecem estes antígenos das células  $\beta$  tenham escapado da deleção tímica. Células T CD4<sup>+</sup> de baixa afinidade podem escapar da seleção negativa tímica e responder aos peptídeos auto-antigênicos que são apresentados por moléculas MHC classe II na periferia, e também podem responder aos neo-antígenos que estão ausentes no timo, mas presentes no tecido alvo na periferia e apresentado por alelos de MHC de classe II (MARRACK; KAPPLER, 2012). Estas células T auto-reativas podem, por sua vez, fornecer ajuda para as células T CD8<sup>+</sup> e células B, o que aumenta a expressão de MHC de classe I nas células  $\beta$  tornando-a um excelente alvo para as células T citotóxicas (WALLBERG; COOKE, 2013).

### 2.5.2. Marcadores imunológicos do DM1

O diagnóstico do DM1 é clínico, mas pode ser corroborado pela presença de um ou mais dos autoanticorpos para antígenos das células das



ilhotas. Nos cuidados de rotina, o *status* dos autoanticorpos pode não estar disponível no diagnóstico e pode nunca ser verificado (as diretrizes de gerenciamento diferem, algumas não recomendam sua medição de rotina ou restringem as medições apenas em situações em que exista dúvida clínica) (CHIANG *et al.*, 2014; AMIEL *et al.*, 2015; NICE, 2015).

Estudos anteriores sugerem que 80% a 90% dos indivíduos com DM1 têm autoanticorpos detectáveis no início da doença (WENZLAU *et al.*, 2007; HAMEED *et al.*, 2011; TRIDGELL *et al.*, 2011; CHIANG *et al.*, 2014; AMIEL *et al.*, 2015; NICE, 2015), com uma prevalência em cerca de 2% em jovens saudáveis na população em geral (KNIP *et al.*, 2010). A positividade para autoanticorpos pode ser menor em grupos étnicos não brancos (LIBMAN *et al.*, 2003; DABELEA *et al.*, 2011; BLACK *et al.*, 2013; WENZLAU *et al.*, 2015; DZIDZONU *et al.*, 2016). No entanto, há incerteza em torno da correlação clínica e demográfica do *status* dos autoanticorpos com a incidência da doença em uma coorte multiétnica não selecionada, incluindo crianças e adultos, utilizando ensaios bem caracterizados e validados (BRAVIS *et al.*, 2018).

Autoanticorpos de células das ilhotas (*Islet Cell Autoantibodies* - ICAs) foram primeiramente reportados há aproximadamente 40 anos utilizando-se ensaios de imunofluorescência (BOTTAZZO; FLORIN-CHRISTENSEN; DONIACH, 1974). Desde então, anticorpos para novos alvos associados às células das ilhotas foram estabelecidos e painéis de autoanticorpos são utilizados com mais frequência para identificar indivíduos em risco para o desenvolvimento do DM1 e para confirmar o DM1 clinicamente diagnosticado no início da doença. Os autoanticorpos associados ao DM1 comercialmente disponíveis incluem anticorpos anti-insulina (*Insulin AutoAntibodies* - IAA), anti-enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (*Glutamic Acid Decarboxylase 65-GAD65*), anti-antígeno 2 do insulinoma (*tyrosine phosphatase-like Insulinoma Antigen 2* - IA2), anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático 512 (*Islet Cell Antibody 512* - ICA512), o qual é autorreativo para o epítipo predominante C-terminal de IA2. As taxas de positividade dos anticorpos no início da doença para indivíduos da população em geral tem sido reportadas (WINTER; SCHATZ, 2011) e são as seguintes: ICA, 70%–80% dos indivíduos; IAA, 60% das crianças; IA2, 60% dos indivíduos; e GAD, 70%–80% dos

indivíduos (WENZLAU *et al.*, 2007; ORBAN *et al.*, 2009; WINTER; SCHATZ, 2011).

Atualmente, as dosagens de GAD e IA-2A são recomendadas para confirmação inicial da suspeita diagnóstica do DM1. Para o diagnóstico do DM1, se GAD e IA-2A forem negativos, as dosagens de ICA em adultos e IAA em crianças, devem ser solicitadas (WINTER; SCHATZ, 2011). A concentração de IAA em crianças se correlaciona com a taxa de progressão do DM1, que podem ser acompanhadas desde o nascimento (STECK *et al.*, 2011; PARIKKA *et al.*, 2012).

A triagem secundária de anticorpos para ICA citoplasmático em parentes de primeiro grau de pessoas com DM1 positivos para GAD e IA2 pode detectar indivíduos com maior risco de desenvolverem DM1. Positividade adicional para ICA pode prever uma progressão mais rápida do DM1 do que positividade para apenas GAD e IA2 (PIETROPAOLO *et al.*, 2005).

ICA são os anticorpos de ilhotas mais difíceis de dosar porque os ensaios para ICA estão sujeitos às variações dos tecidos pancreáticos, conjugado, tempo de incubação, umidade e interpretação científica-biológica. O procedimento de dosagem também é muito laborioso, contudo, os custos relacionados aos descartáveis e reagentes são relativamente baixos. A positividade de ICA decai após o diagnóstico e depois de 10 anos apenas alguns indivíduos permanecem com ICA positivo (aproximadamente 5%). Embora existam duas principais isoformas de GAD, os anticorpos mais frequentes são direcionados a isoforma GAD 65 (massa molecular 65 Da) do que GAD 67 (massa molecular 67 Da). Após o início do DM1, GAD são mais persistentes que ICA (WINTER; SCHATZ, 2011). Por esta razão que a dosagem de GAD é preferida à ICA quando o diagnóstico do diabetes autoimune latente do adulto (*Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood* - LADA) é investigado em indivíduos com diabetes de longa data (ZIMMET *et al.*, 1994). O IA-2A é menos comum no início do DM1 (aproximadamente 60%) do que ICA ou GAD (LIBMAN *et al.*, 1998). IAA é mais comum em crianças jovens com diagnóstico recente de DM1 (aproximadamente 60%) do que em adultos. Uma vez que a insulina exógena é administrada (por mais de 10 dias) a determinação de IAA não tem mais validade porque a injeção de insulina exógena pode induzir respostas de anticorpos à insulina que não podem ser

distinguidas da produção de autoanticorpos. A concentração dos anticorpos anti-insulina é usualmente muito maior do que IAA. De todos os autoanticorpos discutidos, os IAA são os mais difíceis de medir com precisão e reprodutibilidade (WINTER; SCHATZ, 2011).

Além destes, o anticorpo anti-transportador de zinco (Znt8), recentemente incluído no grupo dos marcadores de autoimunidade (WENZLAU *et al.*, 2007), também tem sido usado na clínica. Esse transportador é particularmente expresso nas células  $\beta$ , onde promove o transporte de zinco do citoplasma até o grânulo secretor de insulina e está vinculado à regulação dessa via secretora (WENZLAU *et al.*, 2011). O autoanticorpo ZnT8 pode ser detectado no soro de indivíduos com pré-diabetes e persiste em indivíduos com longo tempo de DM1. Esse autoanticorpo foi relatado em 63% dos indivíduos recém-diagnosticados (GAN; ALBANESE-O'NEILL; HALLER, 2012; WATKINS *et al.*, 2014). O autoanticorpo ZnT8 tem alta especificidade para o DM1 e, se presentes numa quantidade maior que dois, indicam um risco de mais de 90% para a doença (EISENBARTH, G. S; JEFFREY, 2008).

O genótipo HLA parece ter influência sobre a expressão dos autoanticorpos específicos para as ilhotas durante o curso de desenvolvimento do DM1 (PIHOKER *et al.*, 2005). Associações entre HLA-DRQ8 e IA2-A e IAA, HLA-DR4 com IA2-A e IAA, HLA-DR3 e GAD65, e HLA-DR2 e GAD65 foram reportadas (ZIEGLER *et al.*, 1991; HAGOPIAN *et al.*, 1995; GRAHAM *et al.*, 2002). Contudo, a presença de um genótipo HLA em particular não é necessária ou suficiente, mesmo em pessoas com DM1, para resultar em um perfil em particular de autoanticorpos (HAGOPIAN *et al.*, 1995). Os mecanismos destas interações genéticas/humorais ainda necessitam ser elucidadas.

Embora a detecção de autoanticorpos tenha sido importante na identificação de indivíduos com risco para o desenvolvimento do DM1, ainda existem muitas limitações em seu uso geral. Um painel de autoanticorpos constituído por IAA, IA2 e GAD, no momento do início de DM1, identificará, aproximadamente, 20% dos indivíduos com DM1 clínico (WENZLAU *et al.*, 2011). Os autoanticorpos também não fornecem uma determinação precisa do prazo para o início do DM1, porque eles podem ser detectados muitos anos antes do início clínico da doença. Além disso, a presença de autoanticorpos

não é determinante para o desenvolvimento do distúrbio, porque apenas 40% dos familiares positivos para ICA desenvolvem DM1 em um período de 10 anos (BONIFACIO *et al.*, 1990; BINGLEY *et al.*, 1994). Os títulos de autoanticorpos naqueles que desenvolverão DM1 nem sempre aumentam com a aproximação do início da doença, mas podem aumentar e diminuir durante o período pré-diabetes (KNIP *et al.*, 2010). Embora a genética de alto risco e a presença de autoanticorpos estejam ambas relacionadas ao diagnóstico do DM1, para um indivíduo não é inteiramente um prognóstico, particularmente em indivíduos com alto risco HLA e autoanticorpos selecionados da população em geral. Em particular, em um estudo Sueco, a adição da triagem com autoanticorpos GAD à triagem HLA na população em geral não foi suficiente para melhorar o acesso ao risco de DM1 em um grau significativamente clínico (HAGOPIAN *et al.*, 1995).

### 2.5.3. Fatores genéticos

O DM1 tem um forte componente genético e diversos genes têm sua contribuição na patogênese da doença investigada. Genes envolvidos com resposta imune, especificamente os do sistema antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigens* – HLA), estão fortemente associados à susceptibilidade, não somente do DM1, mas de outras desordens autoimunes, como: espondilite anquilosante, artrite reumatoide, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla. Esse sistema compreende genes que codificam moléculas da membrana celular responsáveis por se ligarem a antígenos e apresentá-los à células T para reconhecimento por meio de seus receptores (TCR), e acumulam metade (50%) do risco genético para o DM1 (NOBLE, 2015).

Trata-se de uma região de 3.600 kpb localizada no braço curto do cromossomo 6 que, devido à alta contribuição para a susceptibilidade ao DM1 A, foi identificada como *Diabetes mellitus* insulino-dependente 1 (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 1*–IDDM1), o principal *locus* de risco para o diabetes autoimune (KELLY *et al.*, 2003; EISENBARTH, G. S., 2004). Essa região é altamente polimórfica e abarca genes agrupados em três regiões

(classes) que são relevantes na apresentação de antígenos aos linfócitos T e em outras etapas da resposta imune, como o sistema complemento. O sistema HLA está distribuído nestas três regiões: classe I, II e III, de acordo com sua localização cromossômica. A região de classe I é composta, principalmente, pelos *loci* HLA-A, B, C, que codificam as moléculas presentes praticamente em todas as células nucleadas. A região de classe II engloba os *loci* HLA-DR, -DP e -DQ, que codificam moléculas presentes, principalmente, na superfície de células imunocompetentes, incluindo macrófagos, células dendríticas, monócitos, linfócitos T ativados e linfócitos B. A região de classe III possui genes que codificam componentes do complemento, como C4A, C4B e o fator B, além de conter genes que codificam para a enzima 21-hidroxilase (CYP21), a proteína do choque térmico (Hsp.70) e o fator de necrose tumoral (KELLY *et al.*, 2003; EISENBARTH, G. S., 2004; REVEILLE, 2006).

Os alelos HLA-DR e DQ são os mais influentes na determinação do risco para a doença, mas também têm forte associação como fator de proteção. Alelos DR\*03 e DR\*04 no *locus* HLA-DR são comuns em pacientes diabéticos, numa proporção de 95% contra 50% quando comparado à uma população controle não diabética. Já no *locus* HLA-DQ, os alelos DQA1\*0301, DQB1\*0302, DQA1\*0501 e DQB1\*0201 são os mais expressivos na susceptibilidade à doença (EISENBARTH, G. S; JEFFREY, 2008).

O mecanismo envolvido na predisposição conferida pela região HLA não foi integralmente elucidado, mas acredita-se que uma redução da afinidade de peptídeos autólogos com outras moléculas – devido a uma complexa combinação dos diversos alelos da classe II –, seja o ponto central do possível efeito de risco ou proteção (ALVES *et al.*, 2006).

Além da região HLA, um outro *locus* – que compreende o gene da insulina, no cromossomo 11 e conhecido como *Diabetes mellitus* insulino-dependente 2 (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 2 – IDDM2), também tem forte influência no desenvolvimento do DM1. Trata-se do segundo *locus* em importância para a susceptibilidade genética à doença, com uma contribuição de 10% do risco total para DM1 e sem relação com nenhuma outra desordem autoimune até então (SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

Outros genes que têm em comum a capacidade de interferir na regulação da resposta imune e na tolerância imunológica, ainda que em menor

proporção, também influenciam a susceptibilidade ao DM1, sendo dois dos principais o *CTLA-4* e o *PTPN22*. O *CTLA-4* (*Cytotoxic T-Lymphocyte – associated Antigen 4*) codifica o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico, uma molécula de superfície celular envolvida na regulação dos linfócitos T e B, e na resposta imune como um todo, uma vez que inibe a produção de citocinas por meio de ligação com moléculas das células apresentadoras de antígenos (APCs). Diversos polimorfismos neste gene foram anteriormente associados ao DM1, sem, contudo, oferecer uma base sólida de associação por causa de resultados divergentes entre estudos de populações distintas. O *PTPN22* (*Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22*) codifica a proteína intracelular tirosina fosfatase não receptora tipo 22 particularmente expressa em tecidos linfoides. Essa proteína forma um complexo que inibe a ativação de células T e, segundo estudos funcionais, uma forma variante produzida pelo polimorfismo C1858T pode repercutir sobre T regulatórias e abrandar a regulação da resposta imune. Esse polimorfismo foi associado a outras doenças autoimunes como artrite reumatoide e tireoidite de Hashimoto e, no DM1, tem efeito independente do HLA e do *locus* IDDM2 (SILVA; MORY; DAVINI, 2008; NAYA; ÁLVAREZ, 2016).

O risco genético para DM1 varia entre populações. Variações no DNA, como os polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs), poderiam explicar as diferenças no risco herdado para a doença nessas populações (NOBLE, 2015; PEARSON, 2019).

Polimorfismos de único nucleotídeo são as variações mais abundantes no genoma humano (THE INTERNATIONAL HAPMAP, 2003; INTERNATIONAL HAPMAP, 2005) e têm sido frequentemente empregados como marcadores moleculares de doenças genéticas humanas, na farmacogenética e na reprodução (LIAO *et al.*, 2010). Eles são tipicamente bi-alélicos e ocorrem numa proporção maior que 1% na população (WANG, D. G. *et al.*, 1998), somando mais de 3,1 milhões de variações no genoma humano (INTERNATIONAL HAPMAP *et al.*, 2007). Na prática, SNPs tri-ou tetra-alélicos, inserções, deleções e variações encontrados em menos de 1% da população também são chamados de SNPs (THE INTERNATIONAL HAPMAP, 2003; INTERNATIONAL HAPMAP, 2005).



Os SNPs não são distribuídos uniformemente pelo genoma. Em geral, os SNPs ocorrem com muito menos frequência nas regiões codificadoras do genoma do que em regiões não codificadas (NICKERSON *et al.*, 1998). SNPs em regiões regulatórias de um gene pode afetar as taxas de transcrição, alterando assim a expressão de proteínas correspondentes. Nas regiões codificadoras, os SNPs exônicos podem ser organizados em duas classes: SNPs não-sinônimos que alteram a sequência de aminoácidos dos produtos proteicos; e SNPs sinônimos que não afetam a sequência primária dos produtos. Os polimorfismos não-sinônimos têm sido amplamente caracterizados porque seus efeitos são relativamente fáceis de detectar computacionalmente e experimentalmente. Anteriormente se assumia que proteínas com a mesma sequência derivada de um SNP sinônimo não exerciam efeito discernível sobre uma função genética ou um fenótipo. Essas variantes genéticas foram frequentemente denominadas de "mutações silenciosas". No entanto, foi relatado várias mutações sinônimas alterando a expressão gênica ou enovelamento de proteínas (CHAMARY; PARMLEY; HURST, 2006; SAUNA *et al.*, 2007; GUPTA; LEE, 2008). Foi demonstrado que uma biblioteca de códons sinônimos resulta em diferentes níveis de expressão gênica (KUDLA *et al.*, 2009). Estes resultados demonstram que os SNPs sinônimos também podem produzir diferentes fenótipos.

Baseando-se no dogma central, SNPs podem afetar fenótipos à nível de DNA, RNA e proteico. É importante notar que estes mecanismos não são exclusivos. Um SNP não-sinônimo pode afetar a expressão gênica tanto a nível de RNA como proteico (LIAO *et al.*, 2010).

À nível de DNA – DNA à RNA –, polimorfismos regulatórios podem causar variações potenciais na expressão gênica. Um estudo inicial observou que cerca de um terço das variantes em região promotora do gene humano podem alterar a expressão gênica em 50% ou mais (HOOGENDOORN *et al.*, 2003). Polimorfismos regulatórios podem ser classificados em dois grupos: um polimorfismo de ação *cis* afeta genes dentro ou perto do *locus* e um polimorfismo de ação *trans* em um gene afeta a expressão de outro gene em um *locus* diferente. Um SNP localizado no sítio de ligação de uma proteína regulatória pode alterar sua afinidade com a proteína regulatória e resultar em alteração da expressão gênica (LIAO *et al.*, 2010).

À nível de RNA – RNA à proteína –, SNPs podem alterar o enovelamento do RNAm afetando assim sua estabilidade. Diferentes estruturas de RNAm causadas por SNPs podem alterar a taxa da síntese proteica ou a eficiência do início de tradução. Através da modificação da elongação de tradução, SNPs podem alterar a conformação das proteínas. A substituição de códons sinônimos pode resultar em diferente cinética de tradução proteica, levando à uma molécula com diferentes conformações finais e funções (KOMAR; LESNIK; REISS, 1999). O *splicing* de um pré-RNAm é um mecanismo complexo que depende do correto reconhecimento das sequências codificantes (exons) e não codificantes de proteína (introns) no RNA transcrito (PAGANI *et al.*, 2003). Micro RNAs (miRNA) constituem uma classe de RNAs não-codificantes que podem regular a expressão gênica através do pareamento com a região 3' UTR de RNAs alvos, levando à clivagem do RNA ou repressão de sua tradução (NICOLAS *et al.*, 2009). SNPs em genes codificantes de micro RNA podem alterar o processamento do micro RNA enquanto SNPs localizados em volta de sítios de ligação dos micro RNAs nos RNAm alvos podem afetar a função do micro RNA (LIAO *et al.*, 2010).

À nível traducional e pós-traducional (proteína), se tem investido muito esforço para compreender a função dos SNPs não-sinônimos, uma vez que seus efeitos são relativamente fáceis de caracterizar. Variação na estabilidade da proteína, devido à presença SNPs nas sequências codificantes podem alterar a atividade das enzimas. Os SNPs não-sinônimos podem alterar afinidade às proteínas ligadoras e as propriedades catalíticas. SNPs não-sinônimos podem causar modificações pós-traducionais e, devido ao mecanismo de fosforilação das proteínas, é um elemento chave na transdução de sinal, uma vez que um padrão alterado de fosforilação pode causar diferentes respostas ao ambiente (LIAO *et al.*, 2010).

A associação de SNPs com fenótipos de doenças humanas tem grande potencial para aplicação clínica direta, o que forneceria uma nova e melhorada acurácia de marcadores genéticos para diagnóstico e prognóstico, e, possivelmente, para novos alvos terapêuticos (SUH; VIJG, 2005).



## 2.6. Gene *MMP-2*

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura não-celular e tridimensional distribuída de forma onipresente ao redor dos órgãos, que é formada nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e cuja constituição é bastante particular ao tecido do qual fazem parte. Ela provê suporte físico à integridade e elasticidade do tecido por meio de sua estrutura dinâmica e ininterruptamente remodelada, que auxilia no controle da homeostase tecidual. Seus componentes, por meio de interação com as células epiteliais podem ainda: atuar como ligantes para receptores celulares mediando sinais regulatórios de funções como adesão, proliferação, apoptose, diferenciação, sobrevivência ou migração (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

Além das interações químicas, a MEC também possui propriedades mecânicas que possibilitam a manutenção da integridade e funcionalidade estrutural em nível de tecido. Essas propriedades são dependentes, entre outros constituintes, das fibras elásticas e de colágeno, que fornecem elasticidade e resiliência aos tecidos e são química e termicamente estáveis (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

Para ser remodelada, a MEC depende da clivagem de substâncias que a compõem, o que permite a regulação de sua composição e estrutura, bem como a liberação de moléculas biologicamente ativas, como fatores de crescimento. Proteases que clivam essas substâncias são conhecidas como metaloproteinases de matriz (*Matrix Metallo Peptidases* - MMPs) e são elementos fundamentais no processo de degradação da MEC, possuindo atividade reduzida em condições normais, e atividade abundante durante o reparo tecidual em locais doentes ou inflamados. Essas metaloproteinases são secretadas e posteriormente ativadas no espaço extracelular. Elas podem ser solúveis ou estar ancoradas à membrana celular e clivam componentes da MEC com grande especificidade de substrato (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

As MMPs são uma superfamília de endopeptidases zinco ou cálcio dependentes, implicadas na remodelação da matriz extracelular por meio de degradação ou modificação de proteínas, como: colágeno, elastina e caseína. Elas podem ser excretadas por diversos tipos celulares ou atuar na membrana

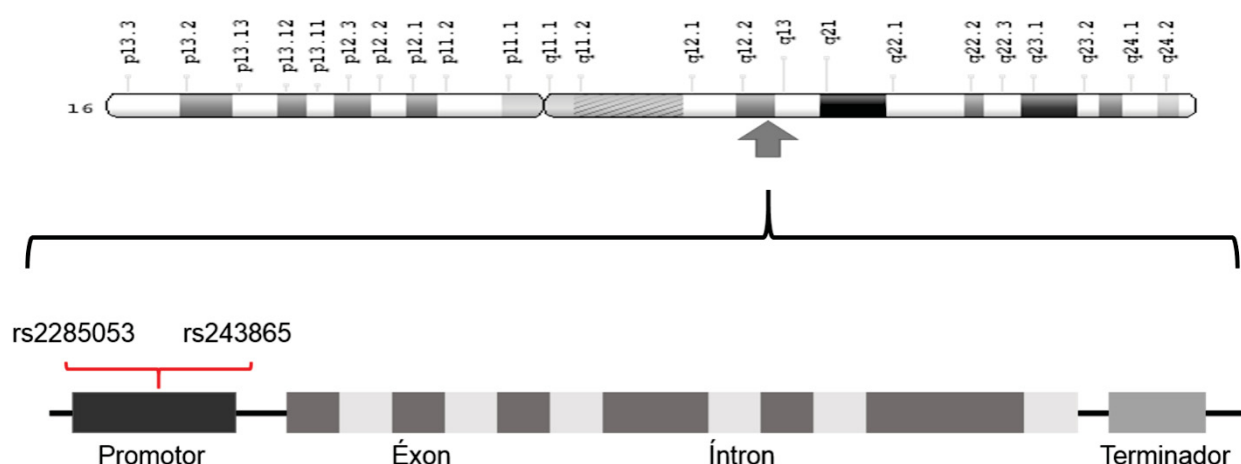
da célula. Mais de 20 tipos diferentes de MMPs já foram identificados e, de acordo com o substrato que degradam, elas podem ser funcionalmente classificadas: colagenase (MMP-1), estromelisina (MMP-3 e MMP-10), entre outras (PEETERS *et al.*, 2015).

As MMPs são altamente reguladas, tanto em nível de transcrição quanto de tradução, e possuem inibidores teciduais – com os quais se equilibram delicadamente em quantidade e distribuição – que coíbem sua atividade de forma dinâmica e característica aos processos pelos quais o tecido é submetido nos estados saudável ou doente. Dentre os inibidores de MMPs, os mais conhecidos são: os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), trombospondina 1/2 e a  $\alpha$ 2-macroglobulina. Eles são uma forma adicional de regulação dessas enzimas e um dos principais componentes da complexa rede de proteases, objeto de diversos estudos em diferentes doenças ou como alvo terapêutico (SAGI *et al.*, 2016).

A metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) é constitutivamente expressa por alguns tipos celulares, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, monócitos, entre outros. Ela desenvolve papel fundamental na remodelação da MEC processando uma ampla variedade de moléculas, como os diversos tipos de colágeno (I, IV, V, VII, X, IX), gelatina, elastina, fibronectina, laminina e atua, ainda, sob moléculas não constituintes de matriz, como pró interleucinas 1 $\beta$  e 8, proteína quimioatratora de monócitos e substâncias com propriedades pró ou anti-angiogênica (FANJUL-FERNANDEZ *et al.*, 2010).

A MMP-2, também conhecida como gelatinase, gelatinase A e colagenase tipo IV – por degradar o colágeno tipo IV, o maior componente estrutural da membrana basal – é codificada pelo gene *MMP-2* localizado no cromossomo 16, composto por 13 éxons e 12 íntrons (HUHTALA; CHOW; TRYGGVASON, 1990) (Figura 5).

FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *MMP-2* E DOS POLIMORFISMOS rs2285053 E rs243865



Localização do gene *MMP-2* e dos polimorfismos rs2285053 e 243865 na região promotora.

Fonte: Adaptado Gene cards  
[www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=MMP2&keywords=mmp-2](http://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=MMP2&keywords=mmp-2) e (YANG, J. *et al.*, 2010)

Mecanismos de regulação da transcrição de *MMP-2* são, provavelmente, os principais pontos de controle que evitam sua larga expressão. A superexpressão de *MMP-2*, em estados patológicos, está associada a um aumento na degradação de proteínas da matriz que precipita processos danosos, como danos vasculares, devido a hiperatividade desta protease (HUHTALA; CHOW; TRYGGVASON, 1990; YANG, J. *et al.*, 2010).

Vários polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) funcionais foram descritos na região promotora do gene *MMP-2* (PRICE; GREAVES; WATKINS, 2001), dentre eles, dois que promovem a substituição de uma citosina (C) por timina (T), localizados na posição -1306 (rs243865) (PRICE; GREAVES; WATKINS, 2001) e na posição -735 (rs2285053) (VASKU *et al.*, 2002). O polimorfismo -1306 C>T (rs243865) abole o sítio de ligação do ativador transcricional proteína específica 1 (*Specificity Protein 1* – Sp1) e, consequentemente, diminui a atividade do promotor. Experimentos de transfecção transitória mostram que a expressão do gene repórter dirigida pelo alelo C da região promotora de *MMP-2* é significativamente maior quando comparado ao alelo T, tanto nas células epiteliais quanto nos macrófagos, indicando o significado funcional deste polimorfismo (PRICE; GREAVES; WATKINS, 2001). Yu e colaboradores também mostraram que a presença do polimorfismo -735C>T (rs2285053) na região promotora de *MMP-2* altera a

sequência consenso do sítio de ligação de Sp1 (CCCTCC→CTCTCC), que a atividade do promotor é 3X maior na presença do alelo C comparado com o alelo T e que existe um efeito sinérgico forte entre os polimorfismos -735T e -1306T em um contexto de haplótipo na redução da atividade transcricional da *MMP-2*. Desta forma, indivíduos portadores do genótipo TT de ambos os polimorfismos produziram menores concentrações de *MMP-2* comparado aos portadores do genótipo CC ou CT. Considerando-se o papel de *MMP-2*, é de se esperar que indivíduos portadores do genótipo CC poderiam ser mais susceptíveis à algumas doenças que resultam da superexpressão desta enzima ao longo da vida. Assim, estes dois polimorfismos poderiam ser marcadores genéticos latentes que auxiliariam na identificação de indivíduos com maior risco para várias doenças (YANG, J. *et al.*, 2010).

Esses polimorfismos já foram associados à várias doenças, incluindo diabetes (BERANEK *et al.*, 2008; YANG, J. *et al.*, 2010; BURACZYNSKA *et al.*, 2015), artrite reumatoide (RODRIGUEZ-LOPEZ *et al.*, 2006), obesidade em crianças e adolescentes (MORGAN *et al.*, 2011; BELO *et al.*, 2013) e hipertensão (SABBATINI *et al.*, 2017).

## 2.7. Gene SUMO4

Modificações pós-traducionais de proteínas (*Post Translational Modification* - PTM) aumentam a diversidade funcional do proteoma pela ligação covalente de grupos funcionais ou proteínas. PTMs incluem a adição de grupos químicos (acetil, metil, nitrosil), modificações nos aminoácidos (deaminação, eliminação), a ligação de moléculas mais complexas como açúcares (glicosilação), lipídeos (isoprenilação) ou outras proteínas (KESSLER; EDELMANN, 2011). No último caso, ubiquitinação (adição de ubiquitina) e sumoilação (adição de SUMO) são PTMs que ocorrem exclusivamente em eucariotos e que desempenham um papel central em uma série de processos biológicos.

Sumoilação é uma das PTMs, em que um membro da família de proteínas modificadoras semelhantes à ubiquitina (SUMO) é conjugado com resíduos de lisina (Lys) nas proteínas alvo. Modificação por sumoilação é um processo reversível e dinâmico, no qual as proteínas modificadas podem ser

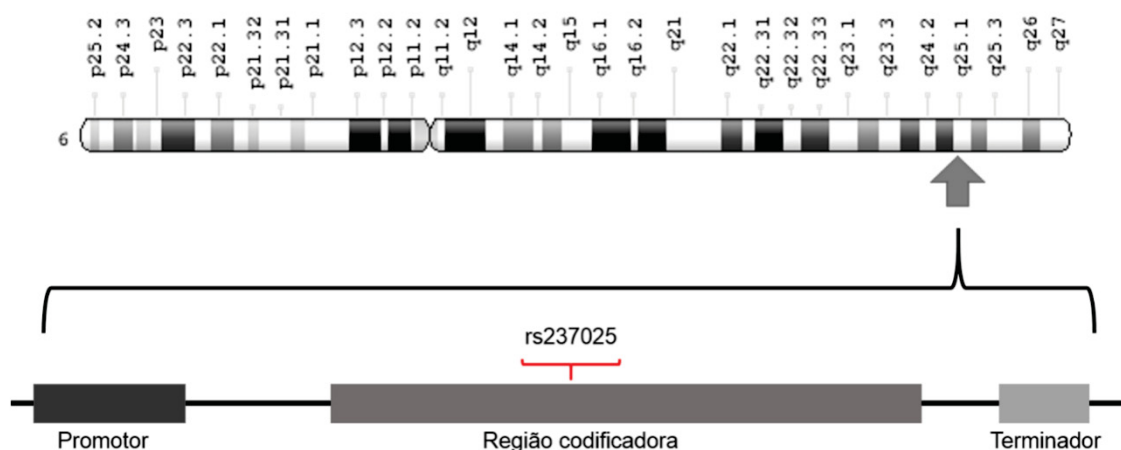
desumoiladas (remoção de SUMO) por proteases específicas sentrina/proteases SUMO específicas (*septrin/SUMO-specific proteases*–SENPs) (GUO, C.; HENLEY, 2014). A ligação reversível de SUMO às proteínas é controlada por vias enzimáticas que são análogas às vias de ubiquitinação (JOHNSON, 2004). Embora a mecânica dos processos de ubiquitinação e sumoilação sejam semelhantes, os alvos modificados nem sempre são os mesmos, e em alguns casos a sumoilação pode até antagonizar com a ubiquitinação (YANG, Y. *et al.*, 2017).

A modificação de proteínas por ubiquitina-símile (*Small Ubiquitin-like MOdifier* - SUMO) está relacionada com o transporte núcleo-citoplasma, regulação de transcrição gênica, progressão no ciclo celular, estabilidade e localização celular de proteínas (HICKEY; WILSON; HOCHSTRASSER, 2012). Modificação pós-tradução reversível com o modificador SUMO (sumoilação) é conservado em todos os eucariotos (YANG, Y. *et al.*, 2017).

Em células de mamíferos, as proteínas SUMO consistem de quatro isoformas: SUMO1, SUMO2, SUMO3 e SUMO4 (JOHNSON, 2004; ENSERINK, 2015). A proteína SUMO4 é constituída de 95 aminoácidos, apresentando homologia de 87% na sequência de aminoácidos SUMO2 (BOHREN *et al.*, 2004) e parece ter participação em eventos relacionados às doenças auto-imunes (PEARCE; MERRIMAN, 2006).

*SUMO4* é um gene da família SUMO, localizado na região SUMO4/MA3K7 do cromossomo 6q25, no interior do intron 6 do gene *MAP3K7IP2* que compreende locais de suscetibilidade ao diabetes em vários grupos étnicos (DUGGIRALA *et al.*, 2001; SALE *et al.*, 2004; SILANDER *et al.*, 2004; XIANG *et al.*, 2004) conhecido como *Diabetes mellitus* insulino-dependente 5 (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 5* – IDDM5) (Figura 6). O gene *SUMO4* possui uma estrutura sem presença de íntros, denominada *Intronless genes* (IGs) e faz parte de um grupo de genes que representa mais de 3% do genoma humano. Este gene foi evolutivamente conservado entre diversas espécies, é requerido para a viabilidade da maioria das células eucarióticas, influencia a atividade e está envolvido com expressão de diversos genes implicados em resposta imune (KOSOY; CONCANNON, 2005; ZHANG *et al.*, 2017).

FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO DO GENE SUMO4 E DO POLIMORFISMO rs237025

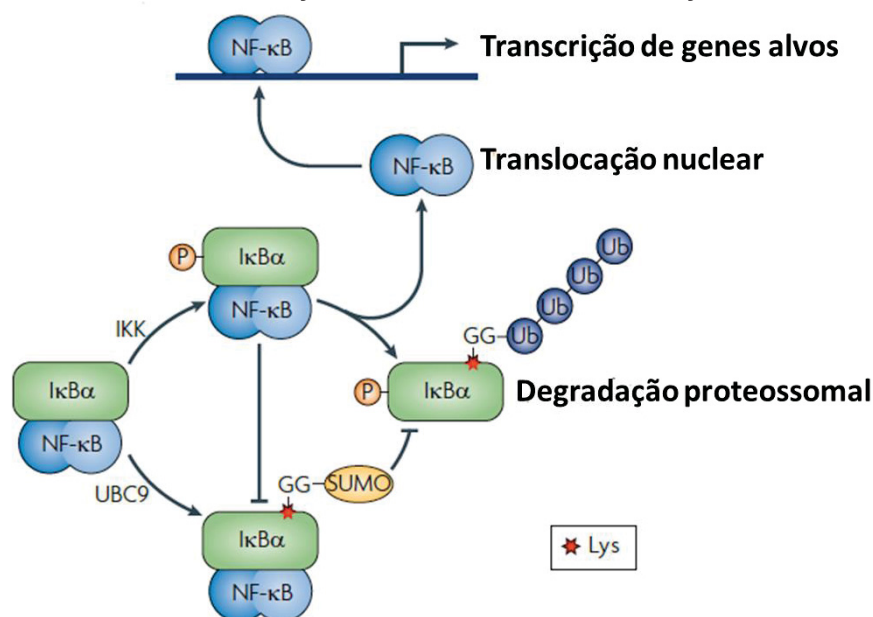


Localização do gene *SUMO4* e do polimorfismo rs237025 na região codificadora.

Fonte: Adaptado Gene cards [www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SUMO4&keywords=sumo4](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SUMO4&keywords=sumo4) e Sinha e colaboradores (2016).

Alguns estudos mostraram que SUMO4 pode ser conjugado ao inibidor do fator nuclear Kappa B alfa (*Inhibitor of Kappa B $\alpha$*  - I $\kappa$ B $\alpha$ ) e regular negativamente a via de sinalização de NF- $\kappa$ B (BOHREN *et al.*, 2004; GUO, D. *et al.*, 2004). NF- $\kappa$ B é um interruptor mestre pró-inflamatório que controla a produção de uma série de marcadores e mediadores inflamatórios, incluindo proteína C reativa, IL-6 fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor -  $\alpha$*  - TNF- $\alpha$ ) e IL-1 (LIU, T. *et al.*, 2017).

I $\kappa$ B $\alpha$  pode ser modificado por ubiquitinação ou sumoilação no mesmo resíduo de lisina (Lys 93). Quando I $\kappa$ B $\alpha$  é fosforilado, sua modificação por SUMO é inibida, e promove modificação pela ubiquitina, marcando I $\kappa$ B $\alpha$  para degradação e liberando a transcrição de NF- $\kappa$ B. Contudo, se o resíduo de lisina 93 for modificado por SUMO, a ubiquitinação induzida por fosforilação e a subsequente degradação proteossomal é inibida (Figura 7) (DESTERRO; RODRIGUEZ; HAY, 1998).

FIGURA 7 - REGULAÇÃO DE I $\kappa$ B $\alpha$  POR FOSFORILAÇÃO E SUMORILAÇÃO

O inibidor do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) é regulado por modificações pós-traducionais. A fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  pela quinase I $\kappa$ B (*I $\kappa$ B Kinase*— IKK) fora do motivo de fosforilação dependente de SUMO (*Phosphorylation-Dependent SUMO Motif* - PDSM) inibe sua modificação por SUMO pela enzima de conjugação similar à ubiquitina 9 (*Ubiquitin-like Conjugating enzyme 9*- UBC9) e promove a modificação por ubiquitinação, marcando I $\kappa$ B $\alpha$  para degradação e liberação da transcrição do fator NF- $\kappa$ B para ativar a transcrição de genes alvos. Modificação por SUMO de I $\kappa$ B $\alpha$  na ausência de fosforilação inibe transcrição do fator NF- $\kappa$ B através do bloqueio do *turnover* de I $\kappa$ B $\alpha$  e liberação do fator NF- $\kappa$ B.

Fonte: Modificado por Gareau e Lima (2010)

Foi encontrado um polimorfismo (rs237025; 163A > G) no gene *SUMO4*, que promove a substituição de uma metionina por valina na posição 55 da proteína. A metionina 55 é conservada evolutivamente entre diversas espécies. A substituição M55V modifica o sítio de fosforilação localizado na posição 54-56, o qual parece ser importante para a conformação molecular e atividade de SUMO4. Guo e colaboradores (2004) observaram uma redução significativa da atividade de sumoilação na variante V55. Células HEK 293 transfectadas com a isoforma SUMO4\*V55 mostraram atividade transcrricional dependente de NF $\kappa$ B 5 vezes maior quando comparadas as células transfectadas com a isoforma SUMO4\*M55 sob estimulação de IL-1. Estes autores também observaram que a substituição de M55V causava aumento de 3 vezes na expressão de IL-12-p40, um gene dependente de NF- $\kappa$ B *in vivo*.

Isto poderia contribuir significativamente para disfunção das células pancreáticas, resistência à insulina e diabetes (SHOELSON; LEE; YUAN, 2003; SPRANGER *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2005; CHOUDHARY *et al.*, 2016). De fato,

o polimorfismo foi associado principalmente ao DM1, mas também ao DM2 em diferentes populações (GUO, D. *et al.*, 2004; KOSOY; CONCANNON, 2005; SINHA *et al.*, 2016).

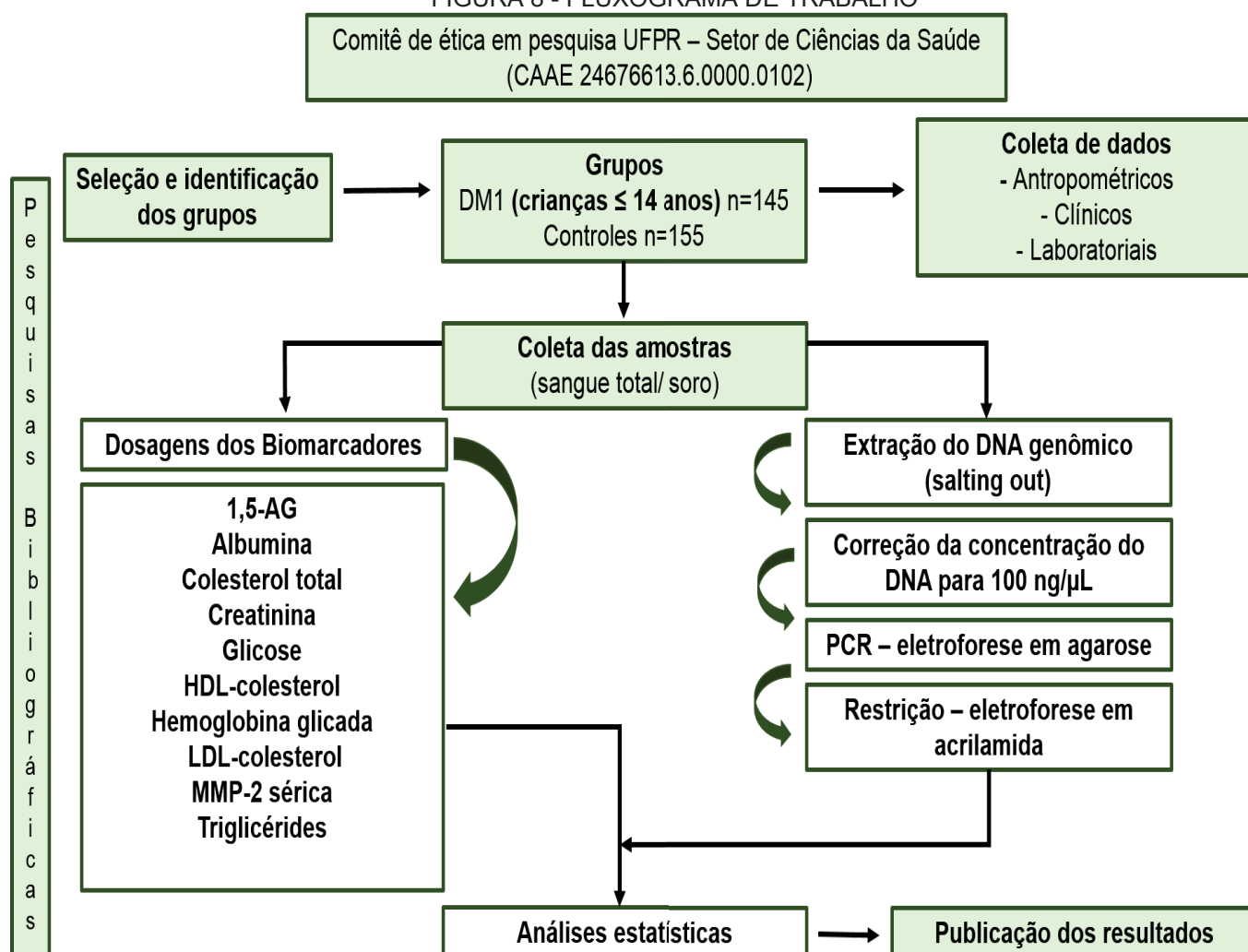


### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS – sob o CAAE: 24676613.6.0000.0102.

O fluxograma (Figura 8) representa de forma esquemática as etapas de trabalho.

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO



Fonte: O autor, 2019.

#### 3.1. Amostras

Amostras de sangue total e soro de 300 crianças (n=300) com idade igual ou inferior a 14 anos classificadas como diabéticos tipo 1 (DM1, n=145) e saudáveis (grupo controle, n=155), foram objeto de análise deste estudo. Os

critérios utilizados para a caracterização dos pacientes com DM1 foram os preconizados pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association- ADA*) (ADA, 2020) e pela Sociedade Internacional de Diabetes Pediátrica e Adolescentes (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes - ISPAD*) (DIMEGLIO *et al.*, 2018).

As coletas intercorreram na Unidade de Endócrino Pediatria (UEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC – UFPR), no Hospital Pequeno Príncipe (HPP) e em escolas municipais de cidades da região metropolitana de Curitiba (RMC), mediante assinatura prévia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por pais ou responsáveis dos voluntários.

Dados clínicos e antropométricos foram obtidos dos indivíduos por meio de entrevista (diabéticos e grupo controle) e dados do prontuário médico (diabéticos).

Foram utilizados tubos secos (BD Vacutainer® K<sub>2</sub>EDTA; Becton, Dickinson, Co.) para coleta de sangue total e tubos com gel separador (Gel BD Vacutainer® SSTTM; Becton Dickinson, Co.) para coleta de soro.

As amostras de sangue total foram homogeneizadas durante 15 minutos e fracionadas em: alíquota de aproximadamente 1,0 mL para determinação de hemoglobina glicada e, volume restante, empregado na obtenção do *buffy coat* (camada de leucócitos utilizada na extração do DNA genômico) por meio de centrifugação, enquanto que as amostras de soro foram submetidas a centrifugação (centrífuga Hermle Z206A) durante 10 minutos a 6.000 rotações por minuto (RPM), alíquotadas em microtubos de 0,5 mL e armazenadas em freezer -20° e -80° para posterior dosagem dos parâmetros bioquímicos.

Estas amostras fazem parte do Biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, homologado pela Portaria Nº 2.201, de 14 de setembro de 2011.

Os critérios de exclusão adotados foram: amostras hemolisadas, lipêmicas e/ou ictéricas. Todas as amostras que se encaixavam nestes critérios foram excluídas dos ensaios.

Os ensaios foram realizados nas dependências físicas do laboratório de Bioquímica Clínica Campus Jardim Botânico, do Departamento de Análises Clínicas da UFPR, utilizando equipamentos e material disponíveis.

### 3.2. Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico, obtido após centrifugação do sangue total (*Buffy coat*), foi extraído pelo método de *salting out* modificado, com desidratação de proteína e precipitação em ambiente saturado com cloreto de sódio (LAHIRI; NURNBERGER JR, 1991).

O DNA extraído foi quantificado por espectofotometria em 260 e 280 nm (S60, Biochrom). Amostras com grau de pureza inferior a 1,5 ou superior a 2,1, na relação A260/280, ou concentração menor que 20 ng/μL foram excluídas dos ensaios.

As amostras de DNA com qualidade inferida pela espectofotometria foram diluídas, com água ultrapura estéril, a 100 ng/μL, para genotipagem pelo sistema PCR-RFLP (*polimerase chain reaction – restriction fragmente length polymorphism*).

### 3.3. Variabilidades genéticas estudadas

O quadro 2 apresenta os genes e os polimorfismos de único nucleotídeo estudados neste trabalho.

QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS

Designação Omim	Posição cromossomo	Localização região	Genes	SNPs	Técnica
120360	16q12.2	Promotora	<i>MMP-2</i>	rs2285053	RFLP
120360	16q12.2	Promotora	<i>MMP-2</i>	rs243865	RFLP
608829	6q25.1	Codificadora	<i>SUMO4</i>	rs237025	RFLP

rs: reference SNP; OMIM®: Online Mendelian Inheritance in Man®; MMP-2: Metaloproteinase de matriz 2; SUMO4: Pequeno modificador semelhante a ubiquitina.

Fonte: Adaptado (NCBI, 2019; OMIM, 2019)

### 3.4. Reação em Cadeia da Polimerase/PCR-RFLP

As variantes genéticas em estudo foram identificadas pela técnica de PCR-RFLP. Fragmentos de 391 pb (rs2285053), 193 pb (rs243865) e 181 pb (rs237025) foram amplificados em termociclador Biocycler (Biosystems), utilizando os protocolos descrito por Sinha e colaboradores (2016) e Yang e colaboradores (2010).

As condições de PCR utilizadas para amplificação do fragmento de 391 pares de base do polimorfismo rs2285053 estão descritas no Quadro 3.

QUADRO 3 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs2285053 DO GENE *MMP-2*

Reagentes	rs2285053 (C-735T) do gene <i>MMP-2</i>	
Oligonucleotídeos iniciadores	F: (5'-GGATTCTTGGCTTGGCGCAGGA-3') R: (5'-GGGGGCTGGGTAAAATGAGGCTG-3')	
	Concentração final	Volumes (reação 10 µL)
Água Regente estéril	—	6,4 µL
Tampão Taq 10x *	1x	1,0 µL
<i>Primer Forward</i> (10 pmol/µL)	0,2 pmol	0,2 µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pmol/µL)	0,2 pmol	0,2 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM	0,6 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,4 µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	0,1 U	0,2 µL
DNA molde (100 ng/µL)	10 ng/µL	1,0 µL
Ciclos Térmicos	Ciclos	Temperatura - tempo
	1 ciclo	94°C por 5 minutos
Ciclos Térmicos:	35 ciclos	94°C por 45 segundos
		69,6°C por 45 segundos
		72°C por 45 segundos
	1 ciclo	72°C por 10 minutos

\*Tampão TAQ 10X, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 750 mM, Tris-HCL (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA platinum polymerase (Invitrogen™).

Fonte: O autor, 2019.

As condições de PCR utilizadas para amplificação do fragmento de 193 pares de base do polimorfismo rs243865 estão descritas no Quadro 4.

QUADRO 4 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs243865 DO GENE *MMP-2*

Reagentes	rs243865 (C-1306T) do gene <i>MMP-2</i>	
Oligonucleotídeos iniciadores	F: (5'-CTTCCTAGGCTGGTCCTTACTGA-3') R: (5'-CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGCT-3')	
	Concentração final	Volumes (reação 10 µL)
Água Regente estéril	—	5,8 µL
Tampão Taq 10x *	1x	1,0 µL
<i>Primer Forward</i> (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM	0,6 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,4 µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	0,1 U	0,2 µL
DNA molde (100 ng/µL)	10 ng/µL	1,0 µL
Ciclos Térmicos	Ciclos	Temperatura - tempo
	1 ciclo	94°C por 5 minutos
Ciclos Térmicos:	35 ciclos	94°C por 45 segundos
		58°C por 45 segundos
		72°C por 45 segundos
	1 ciclo	72°C por 10 minutos

\*Tampão TAQ 10X, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 750 mM, Tris-HCL (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA platinum polymerase (Invitrogen™).

Fonte: O autor, 2019.

As condições de PCR utilizadas para amplificação do fragmento de 181 pares de base do polimorfismo rs237025 estão descritas no Quadro 5.

QUADRO 5 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs237025 DO GENE *SUMO4*

Reagentes	rs237025 do gene <i>SUMO4</i>	
Oligonucleotídeos iniciadores	F: (5'-ATTGTGAACACGGGGATTGTTA-3') R: (5'-CAGCGTTCTGGAGTAATAAAGAAG-3')	
	Concentração final	Volumes (reação 10 µL)
Água Regente estéril	—	6,1 µL
Tampão Taq 10x *	1x	1,0 µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM	0,3 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,4 µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	0,1 U	0,2 µL
DNA molde (100 ng/µL)	10 ng/µL	1,0 µL
Ciclos Térmicos	Ciclos	Temperatura - tempo
	1 ciclo	94°C por 5 minutos
Ciclos Térmicos:	35 ciclos	94°C por 45 segundos
		54°C por 45 segundos
		72°C por 45 segundos
		72°C por 10 minutos
	1 ciclo	72°C por 10 minutos

\*Tampão TAQ 10X, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 750 mM, Tris-HCL (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA platinum polymerase (Invitrogen™).

Fonte: O autor, 2019.

A uma alíquota de 2,0 µL de produto de PCR foi adicionado 3,0 µL de solução tampão de aplicação contendo: glicerol 30%, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose 1,5% (rs2285053) e 2% (rs243865 e rs237025), e então submetida à eletroforese submersa com voltagem constante de 70 volts (~ 40 mA), em temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos em tampão TBE1X (Tris-hidroxi metilaminometano 89 mMol/L; ácido bórico 89 mMol/L e EDTA 1,0 mMol/L, pH 8,2).

Os géis de eletroforese foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV (302 nm), e as imagens obtidas como sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus biotecnologia).

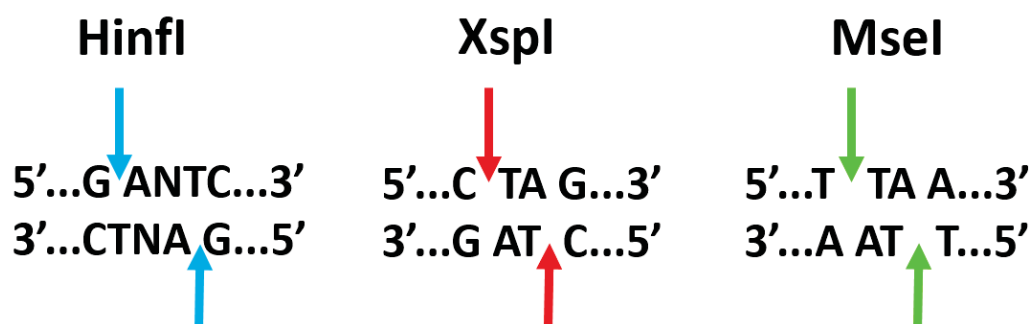
Os amplicons gerados por PCR, após eletroforese, foram digeridos com enzimas de restrição *Hinfl* (rs2285053), *Xspl* (rs243865) e *Msel* (rs237025) em temperatura de 37°C por duas horas. O protocolo utilizado para restrição de cada polimorfismo está descrito no Quadro 6.

QUADRO 6 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs2285053, rs243865 E rs237025

Reagentes	MMP-2 rs2285053	MMP-2 rs243865	SUMO4 rs237025
Produto de PCR (~20 ng/μL)	1,0 μL	1,0 μL	1,0 μL
Tampão 10x (Sigma) *	0,5 μL	0,5 μL	0,5 μL
Água ultrapura estéril	3,3 μL	3,3 μL	3,3 μL
Enzima de Restrição (10 U/μL)	0,2 μL ( <i>Hinfl</i> )	0,2 μL ( <i>Xspl</i> )	0,2 μL ( <i>Msel</i> )
Volume final da reação	5,0 μL	5,0 μL	5,0 μL
Temperatura de Incubação	37°C	37°C	37° C
Tempo de incubação	2 horas	2 horas	2 horas

A Figura 9 apresenta os sítios de restrição das endonucleases utilizadas na investigação dos polimorfismos.

FIGURA 9 - SÍTIOS DE RECONHECIMENTO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



As setas indicam os sítios de restrição das endonucleases *Hinfl*, *Xspl* e *Msel*, respectivamente.  
Fonte: O autor, 2019.

Após incubação para digestão dos produtos de PCR, os fragmentos foram submetidos a nova eletroforese, em gel de poliacrilamida (29:1), a 10% (rs2285053) e 15% (rs243865 e rs237025) em cuba mini Protean 3, Bio Rad (100x75x0,75mm) utilizando tampão TBE 1X. Condições de voltagem, mili-amperagem e tempo, respectivamente, de 120 V, 80 mA. e 1:30h.

Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV e as imagens obtidas como sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus biotecnologia).

### 3.5. Parâmetros bioquímicos

Biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, perfil nutricional e função renal foram quantificados nas amostras de soro de indivíduos dos grupos controle e DM1 em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil) ou sistema automatizado Labmax 400 (Labtest AS), utilizando controles, calibradores e reagentes adequados. E MMP-2 sérica, sistema multiplex.

O analito, o princípio metodológico, o coeficiente de variação e o intervalo de referência para cada biomarcador, estão sumarizados no Quadro 7.

QUADRO 7 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS (PRINCÍPIO METODOLÓGICO, COEFICIENTE DE VARIAÇÃO E INTERVALO DE REFERÊNCIA)

Dosagem	Princípio metodológico	CVa (%)	Intervalo de referência
Albumina	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)	1,6	2,9-4,7g/dL
Colesterol total	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	2,7	Desejável: <170mg/dL Limítrofe: 170-199mg/dL Elevado: >200mg/dL
Creatinina	Colorimétrico (Picrato alcalino)	2,7	0,26-0,81mg/dL
Glicose	Glucose oxidase – Trinder	2,2	<100mg/dL
HDL-colesterol	Enzimático Colorimétrico (Acelerador - Detergente Seletivo)	3,6	Desejável: 35-40 mg/dL
LDL-colesterol	Surfactante Seletivo	4,2	Desejável: <110mg/dL Limítrofe: 110-129mg/dL Elevado: 130mg/dL
Hemoglobina glicada	Imunoensaio (padronizado DCCT)	1,7	4,0-6,0%



Triglicérides	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	3,4	Desejável: <100mg/dL Elevado: >130mg/dL
1,5-AG	Enzimático Glycomark	3,4	>10 µg/mL
MMP-2 sérica	Imunoensaio	-	-

Cva, coeficiente de variação analítica interensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração “normal”. Atualização Diretriz, 2017. \*\*V diretriz, 2013.

\*\*Equação de Friedewald, LDL-colesterol = colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5.

### 3.6. Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para análise das variáveis contínuas para normalidade. A detecção de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa Statistica 8.0.

Variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de Student para amostras não pareadas (bidirecional) ou análise de variância (ANOVA) quando a comparação envolvia mais de dois grupos, sendo os valores expressos em média e desvio padrão ( $\pm 1SD$ ).

As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste U de Mann-Whitney, ou o teste de Kruskal-Wallis (mais de 2 grupos), sendo os valores apresentados como mediana e intervalo interquartil (25%-75%).

Para as variáveis categóricas foram utilizados: teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) ou o teste Exato de Fischer bidirecional, quando apropriado.

As análises de correlação foram realizadas através de testes descritos por Pearson (variáveis com distribuição normal) ou Spearman (variáveis sem distribuição normal). Os genótipos foram caracterizados como 1 (homozigoto usual); 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro) para todas as análises de correlação.

O programa Statistica para windows 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, cálculos das frequências genotípicas e alélicas e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF) foram calculadas com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para comparações das frequências

alélicas com outras populações, foi considerado semelhante quando a frequência do AMF (alelo menos frequente) se encontrava dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

Uma probabilidade inferior a 5% ( $P < 0,05$ ) foi considerada significativa em todas as análises.

Para os resultados que apresentaram significância, foi aplicado o teste de Odds Ratio (OR) que indica a relação entre a hipótese de acontecer um evento entre diversas situações.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados na sequência, em três grupos: dados antropométricos (4.1), parâmetros bioquímicos (4.2) e análises moleculares (4.3).

##### 4.1. Dados antropométricos

A Tabela 1 apresenta os dados antropométricos dos grupos que foram avaliados no estudo.

TABELA 1 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS DE CRIANÇAS CONTROLE E DM1

Parâmetros	Controle n=155	DM1 n=145	P
Idade (anos)	10 (10 – 11)	12 (9 – 13)	<b>&lt;0,001*</b>
Meninos/Meninas	84/71	67/78	0,167
Peso (kg)	38,1 (33,3 – 45)	39 (30,7 – 50,5)	0,556*
Altura (m)	1,43 (1,38 – 1,50)	1,46 (1,35 – 1,57)	0,146*
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18,2 (16,7 – 20,5)	18,3 (16,6 – 21,0)	0,872*
Z-score	0,5 ± 1,08	0,3 ± 0,99	<b>0,033</b>

Os resultados são apresentados como média ± 1 desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). P, probabilidade teste t-Student bidirecional; P\*, probabilidade, teste U de Mann-Whitney

Fonte: O autor, 2019.

#### 4.1.1. Idade e Gênero

A idade mediana do grupo controle (10 anos) foi inferior ( $P < 0,001$ ) à do grupo DM1 (12 anos). Os grupos foram pareados por gênero (Tabela 1).

#### 4.1.2. Peso, Altura, IMC e Z-score

Não houve diferença significativa entre o peso, altura ou IMC nos grupos. Contudo, o grupo DM1 apresenta significativa redução no z-score quando comparado ao grupo controle ( $P=0,033$ ) (Tabela 1). Este resultado é esperado, uma vez que o DM1 está relacionado com uma redução de peso, decorrente das alterações metabólicas da deficiência severa de insulina, e também da maior perda de água (desidratação) decorrente da poliúria, que ocorrem mesmo em pacientes com terapêutica adequada (USHER-SMITH *et al.*, 2015; ADA, 2016).

O IMC é o parâmetro utilizado para o diagnóstico de estados nutricionais dos indivíduos, e é vantajoso por não requerer conhecimento da idade, no entanto a relação peso e altura muda drasticamente com a idade e com o estado de maturação de cada pessoa (WANG, Y. *et al.*, 2006). O z-score, é um parâmetro antropométrico utilizado para avaliar o crescimento e estado nutricional de crianças e adolescentes. O z-score é um indicador antropométrico que fornece uma medida do *status* de crescimento de um indivíduo em comparação a uma referência, e congrega informações como peso, idade e estatura (DIBLEY *et al.*, 1987).

#### 4.2. Análises bioquímicas

A Tabela 2 apresenta as concentrações séricas dos biomarcadores de controle glicêmico (4.2.1), perfil lipídico (4.2.2), perfil nutricional (4.2.3), função renal (4.2.4) e as concentrações plasmáticas de MMP-2 (4.2.5), nos grupos estudados.

Os ensaios utilizados para a quantificação dos biomarcadores estão descritos no item 3.5 da seção Materiais e Métodos (Quadro 7).

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle n=155	DM1 n=145	P
Glicemia em jejum (mg/dL)	93,0 (85,0 – 99,0)	245,5 (163,5 – 334,0)	<b>&lt;0,001*</b>
HbA1c (%)	5,2 (5,1 – 5,4)	9,7 (8,6 – 11,0)	<b>&lt;0,001*</b>
1,5 anidroglicitol (µg/mL)	30,4 (25,8 – 38,3)	3,2 (1,9 – 4,8)	<b>&lt;0,001*</b>
Colesterol total (mg/dL)	148 (128 – 168)	172 (147 – 193,5)	<b>&lt;0,001*</b>
HDL-colesterol (mg/dL)	51,0 ± 11,9	55,1 ± 12,4	<b>0,003</b>
LDL-colesterol (mg/dL)	76,8 (61 – 96,4)	97,5 (83 – 117,5)	<b>&lt;0,001*</b>
Triglicérides (mg/dL)	90 (65 – 126)	66,5 (54 – 85,5)	<b>&lt;0,001*</b>
Albumina (g/dL)	4,2 (4,0 – 4,6)	4,3 (4,0 – 4,5)	0,901*
Creatinina (mg/dL)	0,6 (0,4 – 0,7)	0,7 (0,6 – 0,8)	<b>&lt;0,001*</b>
MMP-2 (pg/mL)	179905,1 ± 60729,7	165266,0 ± 53129,9	0,061

Os resultados são apresentados como média ± 1 desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). P, probabilidade teste t-Student bidirecional; P\*, probabilidade, teste U de Mann-Whitney.

Fonte: O autor, 2019.

#### 4.2.1. Biomarcadores de controle glicêmico

A concentração dos biomarcadores de controle glicêmico foi significativamente maior no grupo DM1 (Tabela 2). Essa diferença era esperada e confirma os critérios de seleção dos grupos, em especial o grupo controle em que é esperado glicemia de jejum dentro dos parâmetros normais, mesmo a glicemia deste grupo não tendo sido feita em jejum.

Glicemia em jejum >180 mg/dL, HbA1c >7,5% e 1,5-AG <10 µg/dL, corroboram o mau controle glicêmico do grupo DM1 (ADA, 2017; SBD, 2018). A baixa concentração de 1,5 anidroglicitol (1,5AG) no grupo DM1 em relação ao controle (3,2µg/mL vs 30,4µg/mL; P<0,001) sugere picos (ou excursões) glicêmicos frequentes e contínuos nos diabéticos, superiores ao limiar renal (~180 mg/dL). Dessa forma, a medida em que ocorre o aumento da glicemia plasmática, ocorre também a redução plasmática do 1,5AG. Isso explica a diferença significativa do 1,5-AG entre os grupos estudados (DUNGAN, 2008). Concentrações reduzidas de 1,5-AG se encontram relacionadas com

hiperglicemia pós-prandial, mesmo em indivíduos com bom controle glicêmico ( $\text{HbA1C} < 8\%$ ) (WON *et al.*, 2009; MEHTA *et al.*, 2012). Desta forma, o uso do 1,5-AG pode ser útil em pacientes com DM1 os quais frequentemente apresentam picos hiperglicêmicos por fazerem uso de insulina exógena, o que não reproduz a homeostasia do sistema fisiológico normal (GREVEN *et al.*, 2010).

O controle glicêmico é indispensável para a manutenção da saúde do paciente diabético por duas principais razões: adequar o tratamento com administração de insulina exógena a doses suficientes para o correto metabolismo glicídico e retardar os efeitos vasculares da hiperglicemia e, consequentemente, danos a sistemas completos, como cardiovascular e urinário (SBD, 2018).

Um controle glicêmico deficiente em pacientes diabéticos repercute por toda sua vida sob a forma de risco vascular e mortalidade aumentados. Em diabéticos adultos a terapia com análogo de insulina foi associada a redução de risco cardiovascular e mortalidade. No DM1 de início na infância, essa associação não é tão simples, evidenciando a complexidade desta população e a necessidade de estudos que indiquem o manejo correto e tratamento adequado a ela. O diagnóstico tardio parece ser um dos principais fatores do controle inadequado, e exporia a criança diabética a um alto risco de desenvolver complicações. Por outro lado, a rápida administração de insulina, logo após o diagnóstico, mostrou-se eficiente no controle glicêmico por pelo menos um ano após o início do tratamento, indicando que: diagnóstico precoce somado a intervenção imediata com insulina são as formas mais eficientes de controlar a glicemia de crianças com DM1 (MAZARELLO PAES *et al.*, 2018).

#### 4.2.2. Biomarcadores de perfil lipídico

O perfil lipídico corresponde a quantificação sérica do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides. Crianças com DM1 que apresentam controle glicêmico pobre, possuem propensão a desenvolver alterações lipídicas (JAMES; POMETTA, 1990; GUY, J. *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2013)

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos em todos os parâmetros de perfil lipídico ( $P < 0,001$ ). As crianças com DM1 apresentaram concentrações maiores de colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol, bem como menor concentração de triglicerídeos quando comparado com o grupo controle (Tabela 2). Nossos resultados estão em concordância com outros trabalhos (GUY, J. *et al.*, 2009; KRISHNAN, S. *et al.*, 2011).

As concentrações de colesterol total e LDL-colesterol no grupo DM1 estão dentro do valor aceito por entidades como ADA e SBD, não caracterizando um quadro dislipidêmico nestes indivíduos (ADA, 2017; SBD, 2018).

O HDL-colesterol, preditor de proteção para risco cardiovascular, também possui concentrações elevadas no grupo DM1 quando comparado ao grupo controle, o que apesar de contraditório, já foi descrito em trabalhos anteriores (GUY, J *et al.*, 2009; SNELL-BERGEON *et al.*, 2010; KRISHNAN, S *et al.*, 2011).

O perfil lipídico é reflexo do mau controle glicêmico dos pacientes DM1, e representa aumento do risco cardiovascular por elevar as concentrações séricas de colesterol total e LDL-colesterol (TELES; FORNÉS, 2012).

Crianças com DM1 exibem alto risco cardiovascular, proporcional a um histórico de infarto do miocárdio. A aterosclerose é lenta e gradual na infância em indivíduos saudáveis, mas torna-se um processo de curso acelerado em indivíduos com DM1, podendo levar a eventos coronários ainda durante a infância ou já na idade adulta. As complicações vasculares decorrentes do DM1 são resultado, dentre outros fatores, de uma função endotelial anormal, que está associada a episódios como hiperglicemia e elevação da concentração de LDL-colesterol. O controle glicêmico intensivo ainda é a melhor forma de retardar os danos vasculares decorrentes do DM1 e pode interferir na velocidade de progressão da aterosclerose (ROBINSON, 2009). No DM1, a insulina utilizada para controle da hiperglicemia, quando ajustadas a doses coerentes a cada paciente, dificilmente leva a aberrações do metabolismo lipídico e auxilia a reduzir o risco cardiovascular (ATHYROS *et al.*, 2018).

#### 4.2.3. Biomarcador de perfil nutricional

Não houve diferença na concentração de albumina ( $P=0,901$ ) nos grupos em estudo (Tabela 2), e as concentrações observadas em ambos os grupos permanecem no intervalo de referência, indicando que não há sinais de perda proteica ou deficiência nutricional nos grupos analisados (SHIMADA, 2013).

A albumina é a proteína plasmática mais abundante do soro humano, representando uma fração de 50% das proteínas totais. Sua molécula é constituída de 584 aminoácidos e suas funções vão desde a manutenção do volume plasmático circulante, transporte de uma ampla gama de substâncias como ácidos graxos, cortisol e drogas, até a oferta de aminoácidos para tecidos periféricos. Sua síntese é exclusivamente empreendida pelo fígado e responsável pelo consumo de 6% da oferta diária de nitrogênio advindo da alimentação (DOS SANTOS *et al.*, 2004).

Diminuição da concentração de albumina pode resultar da diminuição de sua síntese, aumento de sua metabolização, aumento da distribuição no fluido extracelular, ou perda por desordens gastrointestinais ou glomerulares, queimadura e outras lesões (RIFAI; HORVATH; WITTEWER, 2018).

Pacientes com diabetes apresentam alto risco de sofrerem lesão renal. Doença renal em estágio final requerendo diálise ou transplante se desenvolve em 1/3 dos pacientes com DM1 (REDDI; CAMERINI-DAVALOS, 1990). Proteinúria persistente detectável por testes laboratoriais de triagem (taxa de excreção de albumina urinária  $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ ) indica nefropatia diabética manifesta. Está associado à doença de longa data e não é usual em menos de 5 anos após o início do DM1 (RIFAI; HORVATH; WITTEWER, 2018).

#### 4.2.4. Biomarcador de função renal

Em diabéticos, como resultado do mau controle glicêmico, complicações vasculares podem se manifestar, dentre elas, a nefropatia diabética. Essa condição é um quadro crônico de alta prevalência e elevada mortalidade que afeta a sobrevida desses indivíduos (MURUSSI *et al.*, 2003)



A dosagem de creatinina é utilizada na avaliação da filtração glomerular, uma vez que, em condições fisiológicas, até 28% de sua depuração em humanos é via secreção tubular. Trata-se de um biomarcador com pequena variação biológica, que possibilita avaliar a filtração glomerular, bem como diagnóstico e monitoramento refinado da progressão de doença renal (KIRSZTAJN; BASTOS; ANDRIOLO, 2011).

Embora os valores de creatinina diferiram de forma significativa ( $P < 0,001$ ) entre os grupos, sendo que as concentrações foram superiores no grupo DM1 (0,7 mg/dL) quando comparado ao do grupo controle (0,6 mg/dL), estes valores estão dentro do intervalo de referência (0,32-0,71 mg/dL), indicando ausência de lesão renal manifesta (CERIOTTI *et al.*, 2008).

#### 4.2.5. MMP-2 sérica

Na população em estudo, os grupos apresentaram concentrações semelhantes de MMP-2 no soro ( $P = 0,061$ ) (Tabela 2), de forma discordante com Tharikill e colaboradores (2007) que encontraram maiores concentrações plasmáticas no grupo DM1 quando comparada ao grupo controle, mas vale ressaltar que a idade média do grupo DM1 deste estudo foi de  $19,3 \pm 6,0$ , ou seja, maior do que a dos indivíduos deste trabalho e possivelmente com maior tempo de convivência com complicações da doença.

Os dados com relação a atividade das MMPs no DM são contraditórios. Lan e colaboradores (2008) mostraram que cultura de queratócitos tratadas com altas concentrações de glicose por 3 dias exibiram diminuição na quantidade de RNAm de *MMP-2* e *MMP-9*. Concentrações diminuídas de *MMP-2* foram observadas no soro de pacientes com DM2 (RYSZ *et al.*, 2007; POTERYAEVA *et al.*, 2018) e DM2 com nefropatia diabética (RYSZ *et al.*, 2007). De forma contraditória, alguns estudos mostraram concentrações aumentadas de *MMP-2* no DM2 (LEE, S. W. *et al.*, 2005; SIGNORELLI *et al.*, 2005; DEROSA *et al.*, 2007; BERANEK *et al.*, 2008), no DM1 (THRAILKILL *et al.*, 2007) e em condições como micro e macroalbuminúria, retinopatia proliferativa e doença cardiovascular, num estudo com pacientes europeus (PEETERS *et al.*, 2015). Também foi mostrado aumento da expressão de

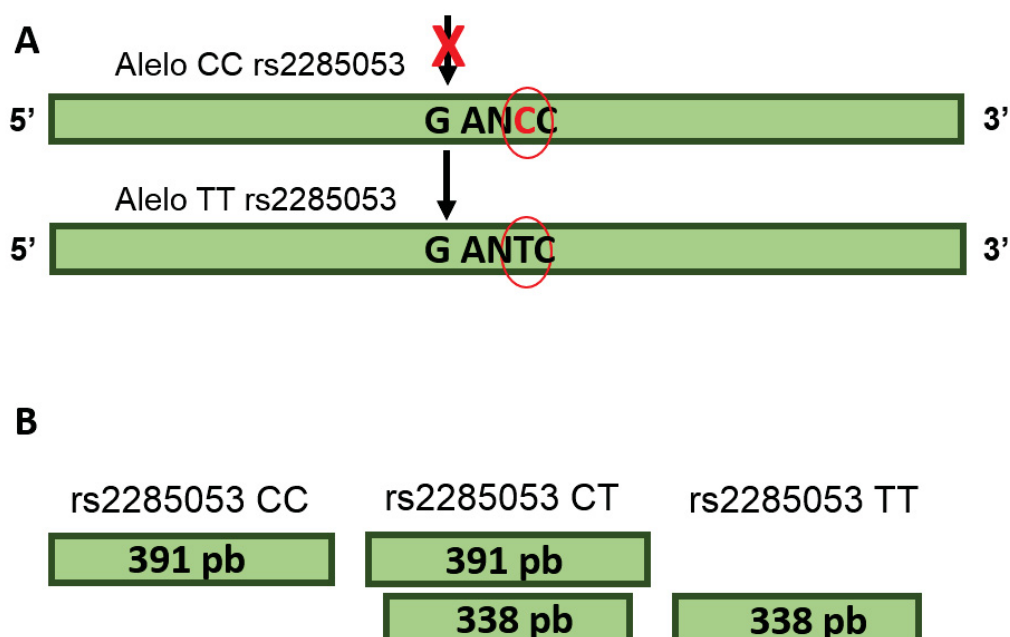
diferentes MMPs, dentre elas a MMP-2, em tecidos de retina de pacientes com retinopatia diabética proliferativa (SALZMANN *et al.*, 2000).

#### 4.3. Análises moleculares

##### 4.3.1. Polimorfismo rs2285053 (-735 C>T) do gene *MMP-2*

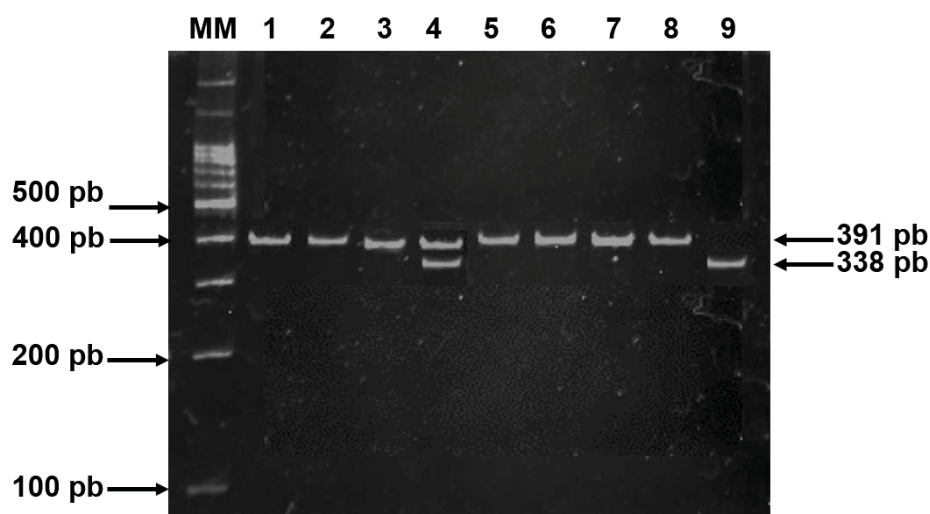
A genotipagem do polimorfismo rs2285053 no gene *MMP-2* foi feita por PCR-RFLP, onde o fragmento de 391 pb foi tratado com a enzima de restrição *HinfI* (Figura 10). A figura 11 traz o perfil eletroforético das amostras após tratamento com a enzima de restrição.

FIGURA 10 - MAPA DE DIGESTÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA *HinfI* PARA O POLIMORFISMO rs2285053



A: O mapa de restrição do amplicon de 391 pb do gene *MMP-2*. As setas indicam o sítio de restrição reconhecido pela enzima *HinfI*. O "X" indica a ausência deste sítio na presença do alelo selvagem rs2285053C e, conseqüentemente, falta de reconhecimento e subsequente clivagem, não alterando o fragmento inicial com 391 pares de base. Na presença do alelo T há reconhecimento e clivagem pela enzima, gerando fragmentos de 391 e 338 pares de base. B: Fragmentos esperados para os genótipos do polimorfismo rs2285053 C>T do gene *MMP-2*. Genótipo CC = 391 pb, CT = 391 pb + 338 pb e TT = 338 pb.  
Fonte: O autor, 2019.

FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs2285053 DO GENE *MMP-2*



Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (TBE 1X) dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *HinfI*. Linha MM: Marcador de Massa Molecular de 100 pb; Linha 1: amostra sem corte; Linha 2, 3, 5, 6, 7 e 8: Homozigoto CC (391 pb); Linha 4: Heterozigoto CT (391 + 338 pb); Linha 9: Homozigoto raro TT (338 pb). Ao lado direito, a massa molecular esperada para os fragmentos de restrição.

Fonte: O autor, 2019.

As frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs2285053 do gene *MMP-2* e as comparações entre os grupos controle e DM1 estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs2285053 NOS GRUPOS EM ESTUDO

Gene/Polimorfismo		Controle n=155	DM1 n=145	P
<i>MMP-2</i> , rs2285053	C/C	110 (70.9%)	123 (84.8%)	<b>0.013</b>
	C/T	41 (26.5%)	21 (14.5%)	
	T/T	4 (2.6%)	1 (0.7%)	
MAF	T-allele	15.8%	7.9%	<b>0.003</b>
	[95% CI]	[12–20%]	[5–11%]	
Dominante	CC vs CT+TT	110/45	123/22	<b>0.040</b>
Recessivo	TT vs CC+CT	4/151	1/144	0.372

Genótipos n(%); 95%IC: intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade

Fonte: O autor, 2019.

Houve diferença estatisticamente significativa nas frequências genotípicas ( $P=0.013$ ), alélicas ( $P=0.003$ ) e para o modelo dominante ( $P=0.040$ ), entre os grupos controle e DM1, evidenciando que o polimorfismo rs2285053 do gene *MMP-2*, na população estudada, foi associado à proteção

ao DM1. Portadores do alelo T tem risco 2,17 vezes menor de desenvolver DM1 com razão de chance (Odds Ratio, OR) 0.46 (95%IC 0.27-0.77), quando comparado aos portadores do alelo C.

A Tabela 4 compara as frequências genotípicas e alélicas deste estudo com as de outras populações.

A frequência do alelo T no grupo controle foi de 15.8% (95%IC 12-20%), sendo semelhante ou ligeiramente superior às frequências observadas em grupos controle em outras populações Brasileiras (BELO *et al.*, 2013; RITTER *et al.*, 2018) e Caucasoides (LIUTKEVICIENE, LESAUSKAITE *et al.*, 2015).

Não foi encontrada a frequência do alelo T para este polimorfismo em pacientes com DM1 em outros trabalhos com outras populações, impossibilitando a análise.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉICAS DO POLIMORFISMO rs2285053 DO GENE *MMP-2* COM A LITERATURA

<b><i>MMP-2</i>, rs2285053</b>			<b>Genótipo (%)</b>			<b>Alelo MAF (%)</b>
<b>Grupo étnico</b>	<b>Característica</b>	<b>N</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>T</b>
<b>Presente estudo</b>	<b>DM1</b>	<b>145</b>	<b>84,8</b>	<b>14,5</b>	<b>0,7</b>	<b>7,9</b>
	<b>Controle</b>	<b>155</b>	<b>70,9</b>	<b>26,5</b>	<b>2,6</b>	<b>15,8</b>
Brasileiros (RITTER <i>et al.</i> , 2018)	Obesidade	63	82	18	0	9
	Controle	57	82	16	2	10
Lituanos (LIUTKEVICIENE <i>et al.</i> , 2015)	AMD	148	85,1	14,2	0,7	8
	Controle	526	78,9	20	1,1	11
Brasileiros (BELO <i>et al.</i> , 2013)	Obesidade	126	87	11	2	8
	Controle	114	73	24	3	<b>15</b>
Brasileiros (SABBATINI <i>et al.</i> , 2017)	Hipertensão resistente	119	81	17	0,8	10
	Hipertensão moderada	136	68	29	2	<b>17</b>
Indianos (SHARMA <i>et al.</i> , 2012)	CVB	410	70,7	27,3	2	16
	Controle	230	81,7	17,4	0,9	10
Chineses (YANG, J. <i>et al.</i> , 2010)	Retinoapatia	151	63,6	33,1	3,3	19,9
	Controle	150	70,7	26,7	2,7	<b>16</b>
Taiwaneses (HSU <i>et al.</i> , 2019)	Leucemia	266	62,8	31,6	5,6	21,4
	Controle	266	66,2	29,3	4,5	<b>19,2</b>

Abreviações: AMD (degeneração macular relacionada à idade), CVB (carcinoma de vesícula biliar).

Fonte: O autor, 2019.

As frequências genotípicas e alélicas para este polimorfismo, em ambos os grupos, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE:  $P=0.938$  e  $P=0.920$  para controles e DM1, respectivamente), e são similares às frequências do alelo T observadas em outras populações Brasileiras (Tabela 4). O tamanho amostral, contudo, poderia explicar o número reduzido de eventos do alelo T na população estudada por esta pesquisa, que detectou indivíduos com genótipo TT nos grupos controle (4) e DM1 (1).

A associação do polimorfismo como fator de proteção ao DM1, observada neste estudo, poderia ser confirmada em estudos posteriores, com um número amostral maior. O aumento do tamanho amostral levaria a uma elevação no número de genótipos de menor frequência e sustentaria a associação protetiva do polimorfismo na população estudada ou a descartaria.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um método aplicado para detectar erros de genotipagem que se baseia no pressuposto de que: em uma grande população de acasalamento aleatório, as frequências genotípicas devem cumprir as proporções de HWE. São elas: a) as frequências alélicas permanecerão constantes em diferentes gerações, independentemente do alelo ser menos frequente ou comum; b) desvios destas proporções podem ser explicados por mutações, seleção de genótipos para transmissão à prole, fluxo gênico entre populações, adaptação e consanguinidade (NAMIPASHAKI; RAZAGHI-MOGHADAM; ANSARI-POUR, 2015; CHEN; COLE; GROND-GINSBACH, 2017).

Não houve associação do polimorfismo rs2285053 com as concentrações dos biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, função renal, perfil nutricional e MMP-2 sérica na população estudada.

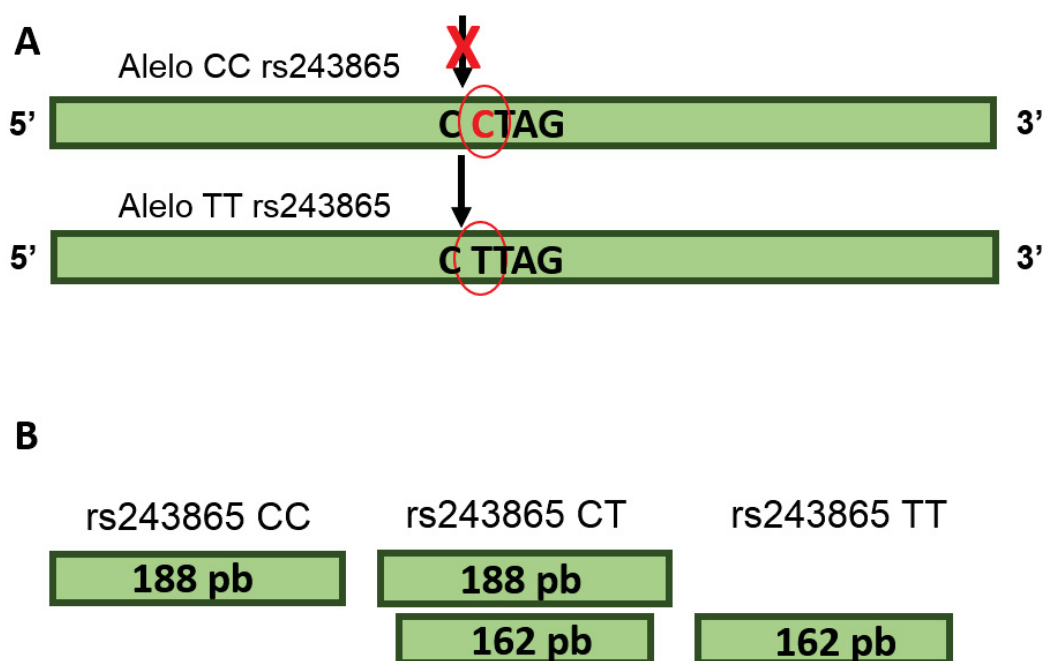
#### 4.3.2. Polimorfismo rs243865 (-1306 C>T) do gene *MMP-2*

A genotipagem do polimorfismo rs243865 no gene *MMP-2* foi feita por PCR-RFLP, onde o fragmento de 193 pb foi tratado com a enzima de restrição *XspI*. A enzima reconhece a sequência CTTAG, assim só há restrição quando o alelo T está presente.

A Figura 12 mostra o sítio reconhecido pela enzima de restrição utilizada na genotipagem do polimorfismo rs243865, e o perfil de fragmentos esperados conforme o genótipo apresentado.

A Figura 13 traz o perfil eletroforético dos fragmentos gerados após o tratamento com a enzima de restrição *XspI* e consequentemente os genótipos obtidos.

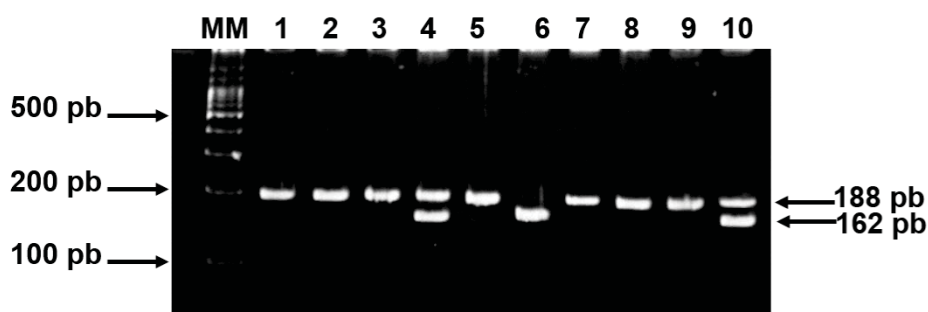
FIGURA 12 - MAPA DE DIGESTÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA *XspI* PARA O POLIMORFISMO rs243865



A: O mapa de restrição do produto de PCR (193 pb) do gene *MMP-2*. As setas indicam o sítio de restrição reconhecido pela enzima *XspI*. O “X” indica a ausência parcial deste sítio na presença do alelo selvagem rs243865C e, consequentemente, falta completa no reconhecimento e subsequente clivagem, não alterando o fragmento inicial com 188 pares de base. Na presença do alelo T, há reconhecimento e clivagem pela enzima, gerando fragmentos de 188 e 162 pares de base. B: Fragmentos esperados para os genótipos do polimorfismo rs243865 C>T do gene *MMP-2*. Genótipo CC = 188 pb, CT = 188 pb + 162 pb e TT = 162 pb.

Fonte: O autor, 2019.

FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs243865 DO GENE *MMP-2*



Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (TBE 1X) dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *XspI*. Linha MM: Marcador de Massa Molecular de 100 pb; Linha 1: amostra sem corte; Linha 2, 3, 5, 7, 8 e 9: Homozigoto CC (188 pb); Linha 4 e 10: Heterozigoto CT (188 + 162 pb); Linha 6: Homozigoto raro TT (162 pb). Ao lado direito, a massa molecular esperada para os fragmentos de restrição.

Fonte: O autor, 2019.

A Tabela 5 exhibe os resultados das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs243865 do gene *MMP-2* para os grupos deste estudo.

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs243865 NOS GRUPOS EM ESTUDO

Gene/Polimorfismo		Controle n=155	DM1 n=145	P
<i>MMP-2</i> , rs243865	C/C	110 (70.9%)	108(74.5%)	0.274
	C/T	38 (24.5%)	35 (24.1%)	
	T/T	7 (4.6%)	2 (1.4%)	
MAF	T-allele [95% CI]	16.8% [13–21%]	13.4% [10–17%]	0.256
Dominante	CC vs CT+TT	110/45	108/37	0.495
Recessivo	TT vs CC+CT	7/148	2/143	0.175

Genótipos n(%);95%IC: intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade

Fonte: O autor, 2019.

As frequências alélicas ( $P=0.256$ ) e genotípicas ( $P=0.274$ ), nos modelos dominante ( $P=0.495$ ) e recessivo ( $P=0.175$ ), não diferiram de forma significativa entre os grupos. Não havendo, portanto, associação do polimorfismo rs243865, na população estudada, a risco ou proteção ao DM1. Essas mesmas frequências, observadas nos grupos saudável e doente, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P=0,1290$ ) e ( $P=0,6570$ ), respectivamente.

A Tabela 6 apresenta as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs243865 na população estudada, e compara com as frequências de outros estudos.



TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs243865 DO GENE *MMP-2* COM A LITERATURA

<b>MMP-2, rs243865</b>			<b>Genótipo (%)</b>			<b>Alelo MAF (%)</b>
<b>Grupo étnico</b>	<b>Característica</b>	<b>N</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>T</b>
<b>Presente estudo</b>	<b>DM1</b>	<b>145</b>	<b>74,5</b>	<b>24,1</b>	<b>1,4</b>	<b>13,4</b>
	<b>Controle</b>	<b>155</b>	<b>70,9</b>	<b>24,5</b>	<b>4,6</b>	<b>16,8</b>
Brasileiros (BELO <i>et al.</i> , 2013)	Obesidade	126	75	22	3	14
	Controle	114	73	25	2	<b>15</b>
Brasileiros (SABBATINI <i>et al.</i> , 2017)	Hipertensão resistente	119	74	25	0,8	13
	Hipertensão moderada	136	64	33	2	19
Indianos (SHARMA <i>et al.</i> , 2012)	CVB	410	67,8	31,2	1	17
	Controle	230	77	22,2	0,9	12
Taiwaneses (HSU <i>et al.</i> , 2019)	Leucemia	266	75,2	23,7	1,1	13
	Controle	266	69,2	28,9	1,9	<b>16,4</b>
Chineses (LIU, O. <i>et al.</i> , 2016)	AD	172	77,4	22,1	0,5	11,6
	Controle	439	79,5	19,8	0,7	10,6
Chineses (LIU, J. W.; CHEN, 2018)	HPS	152	63,2	34,2	2,6	19,7
	Controle	152	69,7	27,0	3,3	<b>16,8</b>
Chineses (LIN, C. M. <i>et al.</i> , 2017)	LLA	376	63,3	30,6	6,1	21,4
	Controle	352	79,8	17,9	2,3	11,2
Chineses (SUN <i>et al.</i> , 2013)	Espondilite anquilosante	100	91	8	1	5
	Controle	520	80,8	18,3	1	10,1
Chineses (SUN <i>et al.</i> , 2013)	Artrite reumatóide	520	78,8	19,6	1,5	11,3
	Controle	520	80,8	18,3	1	10,1
Lituanos (LIUTKEVICIENE ; VILKEVICIUTE; BANEVICUS; <i>et al.</i> , 2018)	Neurite óptica	62	71	29	0	14,5
	Controle	318	59,75	33,96	6,29	23,3
Lituanos (LIUTKEVICIENE ; VILKEVICIUTE; BORISOVAITE; <i>et al.</i> , 2018)	AMD	267	58,8	31,5	9,7	25,5
	Controle	318	59,75	33,96	6,29	23,3

Abreviações:CVB (carcinoma de vesícula biliar), AD (dissecção aórtica), HPS (síndrome hepatopulmonar), LLA (leucemia linfoblástica aguda), AMD (degeneração macular relacionada à idade). Os valores em negrito e itálico correspondem às frequências dentro do intervalo de confiança da frequência do alelo de menor frequência deste estudo (13–21%) descrita na tabela 6.

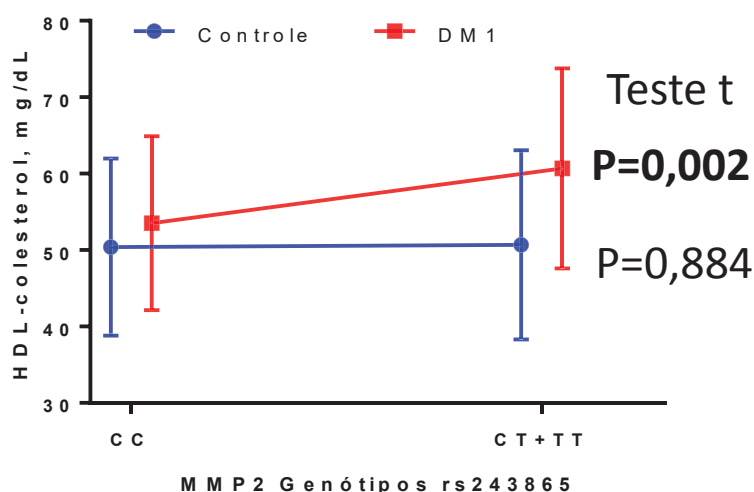
Fonte: O autor, 2019

A frequência do alelo de menor frequência (T), no grupo controle do presente estudo foi de 16.8% (95%IC 13-21%), semelhante a frequência observada em outros estudos realizados na população Brasileira (BELO *et al.*, 2013), inferior a de Caucasoides (LIUTKEVICIENE, VILKEVICIUTE *et al.*, 2018) e em geral superior a de Asiáticos (SUN *et al.*, 2013; LIU, O. *et al.*, 2016; LIN, C. M. *et al.*, 2017).

A frequência do mesmo alelo no grupo DM1 deste estudo, foi de 13.4% (95%IC 10-17%), contudo não foi encontrada na literatura estudos avaliando este polimorfismo em pacientes com DM1.

Houve associação do polimorfismo rs243865 com concentração de marcador bioquímico de perfil lipídico, especificamente, HDL-colesterol no grupo DM1, como demonstrado pela Figura 14.

FIGURA 14 - ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS CT+TT DO POLIMORFISMO rs243865 E AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE HDL-COLESTEROL NO GRUPO DM1



Os resultados são apresentados como média e desvio padrão (barras horizontais). Comparações entre os genótipos CC vs CT+TT com o teste t (bidirecional) apresentaram para os grupos controle (P=0,884) e DM1 (**P=0,002**). Probabilidade (P) significativa (P<0,005).

Fonte: O autor, 2019.

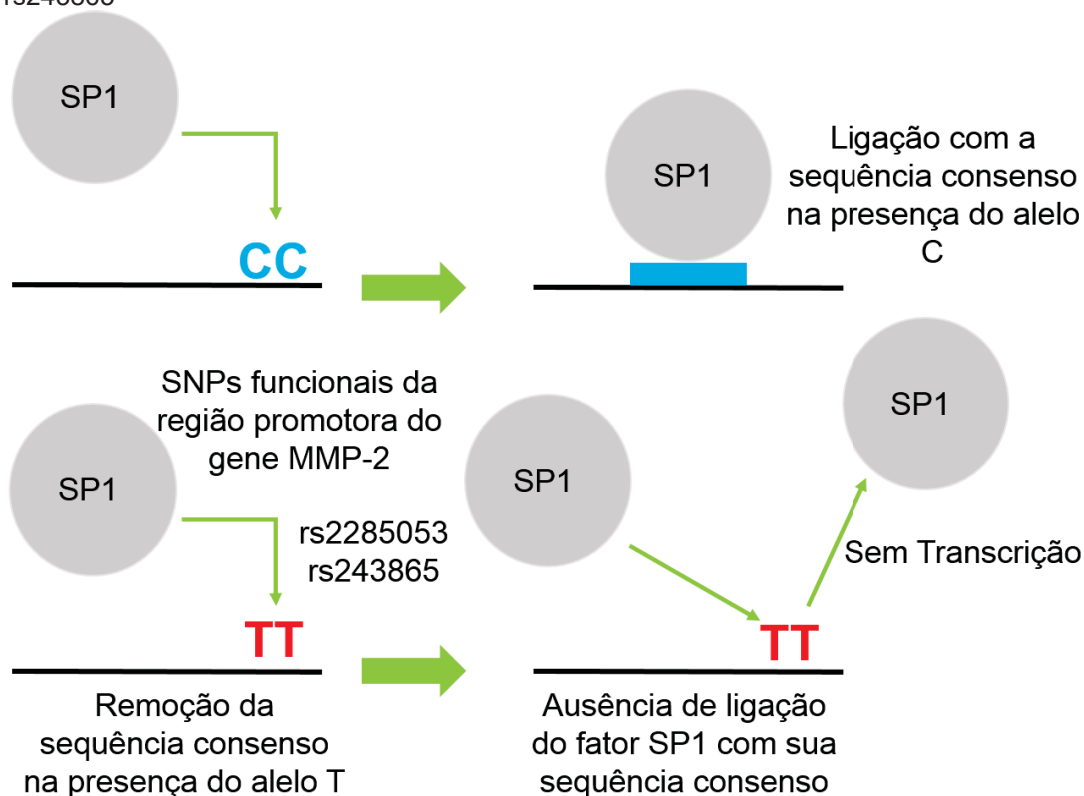
Na presença do alelo T (genótipos CT+TT) do polimorfismo rs243865 a concentração de HDL-colesterol é superior à dos portadores do alelo C em homozigose (CC) somente no grupo DM1.

Miksztoicz e colaboradores (MIKSZTOWICZ *et al.*, 2012) observaram correlação entre MMP-2 e perfil lipídico aterogênico. Reportaram também

correlação inversa com as concentrações plasmáticas de HDL-C e atividade de MMP-2. Esta associação inversa entre o HDL-C e a atividade de MMP-2 também foi encontrada em um estudo com pacientes coronarianos (MUZZIO *et al.*, 2009).

Os polimorfismos funcionais -1306 C>T (rs243865) e -735 (rs2285053) estão localizados no sítio de ligação do ativador transcricional Sp1, e a presença do alelo de menor frequência (T) de ambos os polimorfismos está relacionada com a diminuição de transcrição de MMP-2, estando assim associados a menores concentrações da proteína (PRICE; GREAVES; WATKINS, 2001; YANG, J. *et al.*, 2010) (Figura 15).

FIGURA 15 - MECANISMO DE RUPTURA DA SEQUÊNCIA CONSENSO SP1 PELOS POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP-2* rs2285053 E rs243865



Na presença do alelo C, o sítio de reconhecimento do fator de transcrição Sp1, conhecido como sequência consenso Sp1, não é alterado, permitindo a ligação do fator de transcrição, e consequentemente, expressão do gene. Polimorfismos funcionais como os rs2285053 e rs243865 geram uma ruptura desta sequência consenso, inibindo reconhecimento do fator de transcrição e a expressão da proteína.

Fonte: Adaptado de Saha e colaboradores (2008) e Yan e colaboradores (YANG, J. *et al.*, 2010)

Belo e colaboradores (2013) encontraram associação entre o genótipo CC para o polimorfismo -1306 C>T (rs243865) com maior atividade de MMP2 e obesidade em crianças e adolescentes.

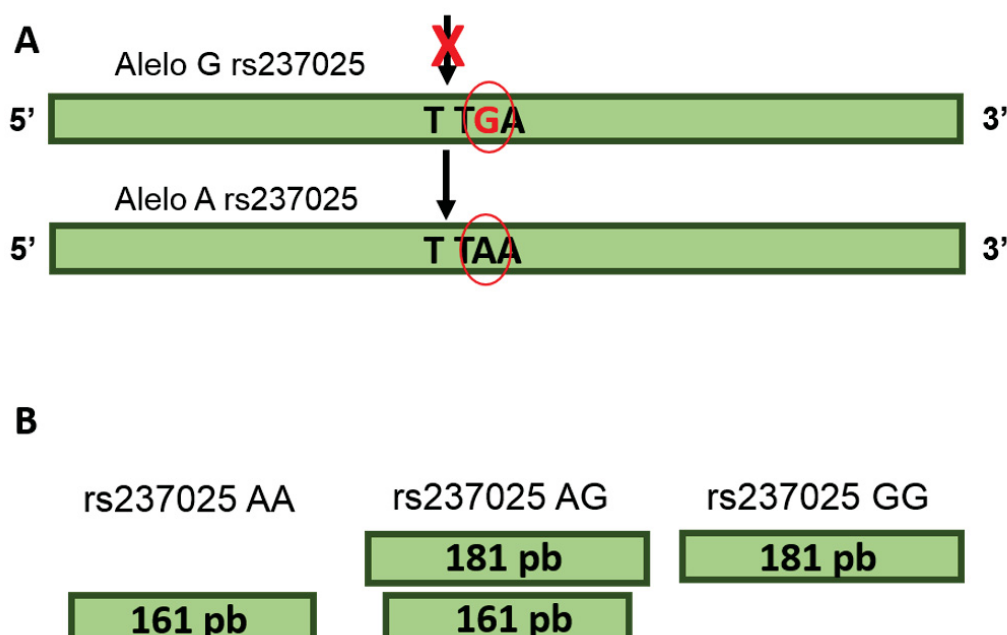
Em nosso estudo, não encontramos diferença de concentração de MMP-2 entre os grupos controle e DM1 (Tabela 2) e nem associação da concentração de MMP-2 com os polimorfismos funcionais -1306 C>T (rs243865) e -735 (rs2285053). Contudo, a quantificação por ELISA não permite a detecção apenas da forma ativa da enzima.

Considerando que estudos clínicos mostraram efeito do alelo T do polimorfismo -1306 C>T (rs243865) na transcrição de *MMP-2* (YU *et al.*, 2004) e nas concentrações circulantes de MMP-2 (THRAILKILL *et al.*, 2007), a presença do alelo T estaria associada a menores concentrações MMP-2, e a correlação negativa entre as concentrações de MMP-2 com o HDL-C (MUZZIO *et al.*, 2009; MIKSZTOWICZ *et al.*, 2012), estes dados suportam a correlação dos genótipos CT+TT do polimorfismo rs243865 e a concentração de HDL-colesterol no grupo DM1 encontrada neste estudo (Figura 15).

#### 4.3.3. Polimorfismo rs237025 do gene *SUMO4*

A Figura 16 mostra a representação esquemática do perfil de fragmentos encontrados conforme os genótipos do polimorfismo rs237025.

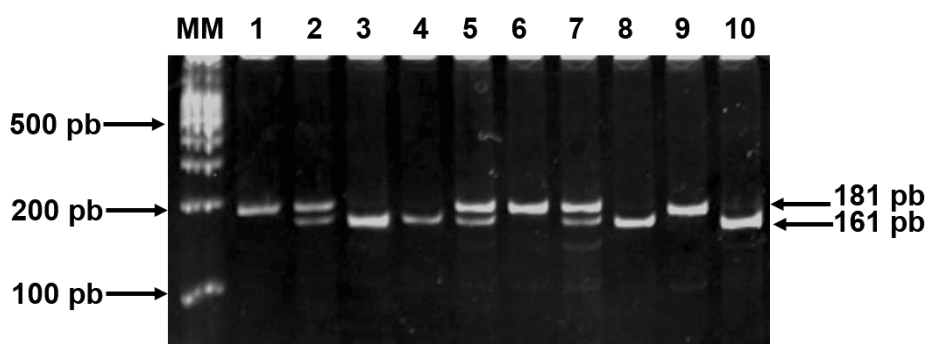
FIGURA 16 - MAPA DE DIGESTÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA *MseI* PARA O POLIMORFISMO rs237025



A: O mapa de restrição do produto de PCR (181 pb) do gene *SUMO4*. As setas indicam o sítio de restrição reconhecido pela enzima *MseI*. O "X" indica a ausência deste sítio na presença do alelo rs243865G e, conseqüentemente, falta no reconhecimento e subsequente clivagem, permanecendo o fragmento inicial de 181 pares de base inalterado. Na presença do alelo A há reconhecimento e clivagem pela enzima, gerando fragmentos de 181 e 161 pares de base. B: Fragmentos esperados para os genótipos do polimorfismo rs237025 A>G do gene *SUMO4*. Genótipo AA= 181 pb, AG = 181 pb + 161 pb e GG=181 pb.  
Fonte: O autor, 2019.

A Figura 17 traz o perfil eletroforético obtido da PCR-RFLP para o polimorfismo rs237025 no gene *SUMO4*. A análise dos fragmentos gerados após a digestão do amplicon de 181 pb com a enzima de restrição *MseI* permite a genotipagem do polimorfismo.

FIGURA 17 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs237025 DO GENE *SUMO4*



Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (TBE 1X) dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *MseI*. Linha MM: Marcador de Massa Molecular de 100 pb; Linha 1: amostra sem corte; Linha 2, 5, e 7: Heterozigoto AG (181 + 161 pb); Linha 3, 4, 8 e 10: Homozigoto AA (161 pb);

Linha 6 e 9: Homozigoto GG (181 pb). Ao lado direito, a massa molecular esperada para os fragmentos de restrição.  
Fonte: O autor, 2019.

A Tabela 7 mostra as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs237025 do gene *SUMO4* e as comparações entre os grupos controle e DM1.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs237025 NOS GRUPOS EM ESTUDO

Gene/polimorfismo		Controle n=155	DM1 n=145	P
<i>SUMO4</i> , rs237025	A/A	38 (24.5%)	38 (26.2%)	0.944
	A/G	85 (54.8%)	78 (53.8%)	
	G/G	32 (20.7%)	29 (20%)	
MAF	G-allele [95% CI]	48.1% [43–54%]	46.9% [41–53%]	0.774
Dominante	AA vs AG+GG	38/117	38/107	0.736
Recessivo	GG vs AA+AG	32/123	29/116	0.889

Genótipos n(%);95%IC: intervalo de confiança de 95%;P, probabilidade.

Fonte: O autor, 2019.

As frequências genotípicas e alélicas deste polimorfismo rs237025, na população estudada – que promove a substituição de um aminoácido Metionina por um aminoácido Valina na posição 55 da proteína SUMO4 –, não foram significativamente diferentes entre os grupos controle e DM1, indicando que os alelos A e G não estão associados ao DM1 como fator de risco ou proteção.

O alelo G deste polimorfismo, de menor frequência na população estudada, no grupo controle (48.1%) não diferiu de forma estatisticamente significativa ( $P=0.774$ ) da frequência observada no grupo DM1 (46.9%), e nos modelos dominante ( $P=0.736$ ) e recessivo ( $P=0.889$ ) também não houve associação com a doença entre os grupos.

A frequência do alelo A, não foi significativamente distinta entre os grupos do presente estudo, com 38 indivíduos de ambos os grupos controle (24.5%) e DM1 (26.2%) com o genótipo AA, e 85 (54.8%) e 78 (53.8%) com o genótipo AG, respectivamente.

A Tabela 8 mostra as comparações das frequências deste estudo com outros realizados em outras populações.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs237025 DO GENE *SUMO4* COM A LITERATURA

<b><i>SUMO4</i>, rs237025</b>			<b>Genótipo (%)</b>			<b>Alelo MAF (%)</b>
<b>Grupo étnico</b>	<b>Característica</b>	<b>N</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>T</b>
<b>Presente estudo</b>	<b>DM1</b>	<b>145</b>	<b>26,2</b>	<b>53,8</b>	<b>20</b>	<b>46,9</b>
	<b>Controle</b>	<b>155</b>	<b>24,5</b>	<b>54,8</b>	<b>20,7</b>	<b>48,1</b>
Espanhóis	DM1	170	17,7	54,7	27,6	55
	Controle	151	20,6	53,6	25,8	<b>52,6</b>
EUA (Flórida)	DM1	244	19,3	46,7	34	57,4
	Controle	274	29,9	48,9	21,2	<b>45,6</b>
Taiwaneses	DM1	96	41,6	53,2	5	31,8
	Controle	191	49,8	40,8	9,4	29,8
Chineses	DM1	96	41,2	40	18,8	38,5
	Controle	188	46,4	45,7	7,9	30,9
Coreanos	DM1	97	31,9	48,5	19,6	<b>43,8</b>
	Controle	112	46,4	42,9	10,7	32,1
<b>(GUO, D. <i>et al.</i>, 2004)</b>						
EUA (Flórida)	DM1	197	20,8	45,7	33,5	56,3
(QU <i>et al.</i> , 2005)	Controle	1060	24,3	50,4	25,3	<b>50,5</b>
Coreanos	DM1	386	38	48,5	13,5	37,7
(ZHANG <i>et al.</i> , 2017)	Controle	553	47,9	41,6	10,5	31,3
Japoneses	DM1	472	41,3	49,6	9,1	33,9
	Controle	641	50,1	40	9,9	30
Coreanos	DM1	69	42	45	13	35,5
	Controle	102	44,1	33,3	10,8	27,5
<b>(NOSO <i>et al.</i>, 2006)</b>						
Japoneses	DM1	411	41,4	48,9	9,7	34,2
(TSURUMARU <i>et al.</i> , 2006)	Controle	551	50,1	39,9	10	29,9
Britânicos	DM1	3442	22,1	51,7	26,2	<b>51,8</b>
(ZHANG <i>et al.</i> , 2017)	Controle	3788	24,4	49	26,6	<b>51,1</b>
Taiwaneses	DM2 normo	253	52,6	40,7	6,7	27,1
Estratificação pelo status de albumina	DM2 micro	112	45,5	47,3	7,1	30,9
	DM2 macro	65	36,9	46,2	16,9	40
<b>(LIN, H. Y. <i>et al.</i>, 2007)</b>						
Indianos (SINHA <i>et al.</i> , 2016)	Nefropatia diabética	201	26,3	44,3	29,4	51,5
	Controle	216	32,9	47,7	19,4	42,8
Sauditas (ALZOLIBANI <i>et al.</i> , 2015)	Psoríase	85	21,4	53,6	25	51,8
	Controle	80	30,4	50	19,6	<b>44,6</b>

Os valores em negrito e *italico* correspondem às frequências dentro do intervalo de confiança da frequência do alelo de menor frequência deste estudo (13–21%) descrita na tabela 7.

Fonte: O autor, 2019.



A frequência do alelo G no grupo DM1, considerando o intervalo de confiança de 95%, foi 46.9% (95%IC 41-53%) sendo superior às descritas em outras populações — geralmente do leste asiático, onde esse alelo não tem uma frequência tão alta quanto em caucasianos —, como Taiwaneses (31,8%), Coreanos (43,8%) (GUO, D. *et al.*, 2004) e Japoneses (33,9) (NOSO *et al.*, 2006).

A frequência deste alelo no grupo controle, considerando o mesmo intervalo de confiança de 95%, foi 48,1% (95%IC 43-54%), e também se assemelha ou se aproxima de frequências encontradas em estudos com Indianos (42,8%) (SINHA *et al.*, 2016) e Sauditas (44,6%) (ALZOLIBANI *et al.*, 2015), além de Europeus Espanhóis (52,6%) Americanos Estadunidenses (45,6%) (GUO, D. *et al.*, 2004) e Europeus Britânicos (51,1%) (ZHANG *et al.*, 2017).

Ambas as frequências genotípicas observadas nos grupos controle e DM1 do presente estudo estão dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg com valores de  $P=0,220$  e  $P=0,335$ , respectivamente.

Ambos os alelos A e G do polimorfismo rs237025 já foram associados ao DM1 como fator de risco em outras populações. O alelo A nos trabalhos de (KOSOY; CONCANNON, 2005) e (SINHA *et al.*, 2016). Alelo G Nos relatos de (ZHANG *et al.*, 2017).

A associação do polimorfismo rs237035, feita através das análises estatísticas descritas no tópico de material e métodos deste trabalho, com dados antropométricos como idade, sexo, peso altura IMC e Z-score não mostrou associação dos genótipos AA, AG ou GG com quaisquer um destes dados na população estudada.

Da mesma forma, associações marginais com as concentrações séricas de biomarcadores, posteriormente analisadas com testes de maior precisão, não mostraram associação estatisticamente significativa dos genótipos heterozigoto AG ou homozigoto AA e GG do polimorfismo rs237025 na população estudada.

Concentrações séricas de glicemia em jejum, hemoglobina glicada fração A1c, 1,5 anidroglicitol (controle glicêmico), colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides (perfil lipídico), albumina (perfil

nutricional) e creatinina (função renal) não são influenciados pelos genótipos deste polimorfismo em ambos os grupos, controle e DM1, na população estudada.

## 5. CONCLUSÕES

- O polimorfismo rs2285053 do gene *MMP-2* foi associado à proteção ao DM1;
- O polimorfismo rs243865 do gene *MMP-2* não foi associado a risco ou proteção ao DM1, mas a presença do alelo T nos genótipos CT+TT está associada a maiores concentrações de HDL-colesterol no grupo DM1;
- Não houve associação dos rs2285053 e rs243865 do gene *MMP-2* com as concentrações plasmáticas de MMP-2 e nem diferença na concentração de MMP-2 entre os grupos controle e DM1;
- O polimorfismo rs237025 do gene *SUMO4* não foi associado a risco ou a proteção ao diabetes mellitus tipo 1 na população estudada

## 6. REFERÊNCIAS

ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2016. **Diabetes Care**. v. 39 Suppl 1, p. S1-112. 2016.

ADA. Standards of medical care in diabetes 2017. **Diabetes care**. v. 40 (suppl. 1), p. 2017.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes Care**. v. 43, n.Suppl 1, p. S1-S2. 2020.

ALFADHLI, E. M. Gestational diabetes mellitus. **Saudi Med J**. v. 36, n.4, p. 399-406. 2015.

ALVES, C. D. A. D. *et al.* Distribuição e frequência de alelos e haplotipos HLA em brasileiros com diabetes melito tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 50, n.3 p. 436-444. 2006.

ALZOLIBANI, A. A. *et al.* Genetic polymorphisms of NFkappaB1 -94 del/ins ATTG, NFkappaB1A 2758 A>G and SUMO rs237025 G>A in psoriasis. **Int J Health Sci (Qassim)**. v. 9, n.1, p. 25-33. 2015.

AMIEL, S. A. *et al.* Diagnosis and management of type 1 diabetes in adults: summary of updated NICE guidance. **BMJ**. v. 351, p. h4188. 2015.

ARIF, S. *et al.* Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death. **Diabetes**. v. 60, n.8, p. 2112-9. 2011.

ATHYROS, V. G. *et al.* Diabetes and lipid metabolism. **Hormones (Athens)**. v. 17, n.1, p. 61-67. 2018.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**. v. 383, n.9911, p. 69-82. 2014.

BACHMANN, M. *et al.* IFNalpha converts IL-22 into a cytokine efficiently activating STAT1 and its downstream targets. **Biochem Pharmacol**. v. 85, n.3, p. 396-403. 2013.

BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 45, n.2, p. 175-180. 1999.

BARBOSA, J. H.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 52, n.6, p. 940-950. 2008.

BARCELO, A. *et al.* The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean in 2015: Evidence for decision and policy makers. **J Glob Health**. v. 7, n.2, p. 020410. 2017.

BELO, V. A. *et al.* Effect of metabolic syndrome risk factors and MMP-2 genetic variations on circulating MMP-2 levels in childhood obesity. **Mol Biol Rep**. v. 40, n.3, p. 2697-704. 2013.

BERANEK, M. *et al.* Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. **Mol Vis**. v. 14, p. 1114-21. 2008.

BINGLEY, P. J. *et al.* Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. **Diabetes**. v. 43, n.11, p. 1304-10. 1994.

BINGLEY, P. J. *et al.* Type 1 Diabetes TrialNet: A Multifaceted Approach to Bringing Disease-Modifying Therapy to Clinical Use in Type 1 Diabetes. **Diabetes care**. v. 41, n.4, p. 653-661. 2018.

BLACK, M. H. *et al.* HLA-associated phenotypes in youth with autoimmune diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 14, n.2, p. 121-8. 2013.

BOHREN, K. M. *et al.* A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. **J Biol Chem**. v. 279, n.26, p. 27233-8. 2004.

BONIFACIO, E. *et al.* Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. **Lancet**. v. 335, n.8682, p. 147-9. 1990.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 15, n.12, p. 786-801. 2014.

BONORA, E.; TUOMILEHTO, J. The pros and cons of diagnosing diabetes with A1C. **Diabetes Care**. v. 34 Suppl 2, p. S184-90. 2011.

BOTTAZZO, G. F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet**. v. 2, n.7892, p. 1279-83. 1974.

BRAVIS, V. *et al.* Relationship between islet autoantibody status and the clinical characteristics of children and adults with incident type 1 diabetes in a UK cohort. **BMJ Open**. v. 8, n.e020904, p. 9. 2018.

BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. **Diabetes**. v. 54, p. 1615-25. 2005.

BURACZYNSKA, M. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) gene polymorphism and cardiovascular comorbidity in type 2 diabetes patients. **J Diabetes Complications**. v. 29, n.6, p. 829-33. 2015.

CAI, D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med**. v. 11, n.2, p. 183-90. 2005.

CALDERON, B.; UNANUE, E. R. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. **Curr Opin Immunol**. v. 24, n.1, p. 119-28. 2012.

CERIELLO, A. *et al.* Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. **Diabetes**. v. 57, n.5, p. 1349-54. 2008.

CERIOTTI, F. *et al.* Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. **Clin Chem**. v. 54, n.3, p. 559-66. 2008.

CHAMARY, J. V.; PARMLEY, J. L.; HURST, L. D. Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. **Nat Rev Genet**. v. 7, n.2, p. 98-108. 2006.

CHEN, B.; COLE, J. W.; GROND-GINSBACH, C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. **Front Genet**. v. 8, p. 167. 2017.

CHIANG, J. L. *et al.* Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 37, n.7, p. 2034-54. 2014.

CHIASSON, J. L. *et al.* Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. **Cmaj** v. 168, n.7, p. 859-866. 2003.

CHIEFARI, E. *et al.* Gestational diabetes mellitus: an updated overview. **J Endocrinol Invest.** v. 40, n.9, p. 899-909. 2017.

CHOUDHARY, S. *et al.* Plausible anti-inflammatory mechanism of resveratrol and caffeic acid against chronic stress-induced insulin resistance in mice. **Inflammopharmacology.** v. 24, n.6, p. 347-361. 2016.

CLARK, M.; KROGER, C. J.; TISCH, R. M. Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response. **Front Immunol.** v. 8, p. 1898. 2017.

COWIE, C. C. *et al.* Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. **Diabetes Care.** v. 33, n.3, p. 562-8. 2010.

DA SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural, Santa Maria.** v.40, n.n.4, p. p.994-1002. 2010.

DABELEA, D. *et al.* Etiological approach to characterization of diabetes type: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes Care.** v. 34, n.7, p. 1628-33. 2011.

DANESE, E. *et al.* Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. **J Diabetes Sci Technol.** v. 9, n.2, p. 169-76. 2015.

DEROSA, G. *et al.* Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. **Heart Vessels.** v. 22, n.6, p. 361-70. 2007.

DESTERRO, J. M.; RODRIGUEZ, M. S.; HAY, R. T. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. **Mol Cell.** v. 2, n.2, p. 233-9. 1998.

DIBLEY, M. J. *et al.* Interpretation of Z-score anthropometric indicators derived from the international growth reference. **The American journal of clinical nutrition.** v. 46, n.5, p. 749-762. 1987.

DIMEGLIO, L. A. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Glycemic control targets and glucose monitoring for children, adolescents, and young adults with diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 19 Suppl 27, p. 105-114. 2018.



DOS SANTOS, N. S. J. *et al.* Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista Nutrição [online]**. v. 17, n.3, p. 2004.

DUGGIRALA, R. *et al.* A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. **Am J Hum Genet**. v. 68, n.5, p. 1149-64. 2001.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn**. v. 8, n.1, p. 9-19. 2008.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**. v. 39, n.4, p. 435-50, 2003. 2003.

DUVILLIE, B. *et al.* Increased islet cell proliferation, decreased apoptosis, and greater vascularization leading to beta-cell hyperplasia in mutant mice lacking insulin. **Endocrinology**. v. 143, n.4, p. 1530-7. 2002.

DZIDZONU, D. K. *et al.* Ethnic differences in the incidence of type 1 diabetes in Norway: a register-based study using data from the period 2002-2009. **Pediatr Diabetes**. v. 17, n.5, p. 337-41. 2016.

ECKHARDT, B. J. *et al.* Glycated Hemoglobin A(1c) as screening for diabetes mellitus in HIV-infected individuals. **AIDS Patient Care STDS**. v. 26, n.4, p. 197-201. 2012.

EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. **Adv Exp Med Biol**. v. 552, p. 306-10. 2004.

EISENBARTH, G. S.; JEFFREY, J. The natural history of type 1A diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 52, n.2, p. 146-155. 2008.

EIZIRIK, D. L. *et al.* The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. **PLoS Genet**. v. 8, n.3, p. e1002552. 2012.

ENSERINK, J. M. Sumo and the cellular stress response. **Cell Div**. v. 10, p. 4. 2015.

FANJUL-FERNANDEZ, M. *et al.* Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochim Biophys Acta**. v. 1803, n.1, p. 3-19. 2010.

FAYFMAN, M.; PASQUEL, F. J.; UMPIERREZ, G. E. Management of Hyperglycemic Crises. **Medical Clinics of North America**. v. 101, n.3, p. 587-606. 2017.

FLETCHER, B.; GULANICK, M.; LAMENDOLA, C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. **J Cardiovasc Nurs**. v. 16, n.2, p. 17-23. 2002.

GAN, M. J.; ALBANESE-O'NEILL, A.; HALLER, M. J. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**. v. 42, n.10, p. 269-91. 2012.

GAREAU, J. R.; LIMA, C. D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 11, n.12, p. 861-71. 2010.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**. v. 107, n.9, p. 1058-70. 2010.

GIWA, A. M. *et al.* Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. **World J Diabetes**. v. 11, n.1, p. 13-25. 2020.

GOLDIN, A. *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**. v. 114, n.6, p. 597-605. 2006.

GRAHAM, J. *et al.* Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.5, p. 1346-55. 2002.

GREVEN, W. L. *et al.* Glycemic variability in inadequately controlled type 1 diabetes and type 2 diabetes on intensive insulin therapy: a cross-sectional, observational study. **Diabetes Technol Ther**. v. 12, n.9, p. 695-9. 2010.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 46, n.1, p. 16-26. 2002.

GROUP, S. F. D. I. Y. S. *et al.* The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Pediatrics**. v. 118, n.4, p. 1510-8. 2006.

GUO, C.; HENLEY, J. M. Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. **IUBMB Life**. v. 66, n.2, p. 71-7. 2014.

GUO, D. *et al.* A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. **Nat Genet.** v. 36, n.8, p. 837-41. 2004.

GUPTA, P.; LEE, K. H. Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates. **Biotechnol Bioeng.** v. 101, n.5, p. 967-74. 2008.

GUY, J. *et al.* Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. **Diabetes Care.** v. 32, n.3, p. 416-20. 2009.

GUY, J. *et al.* Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. **Diabetes care.** v. 32, n.3, p. 416-420. 2009.

HAGOPIAN, W. A. *et al.* Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. **J Clin Invest.** v. 95, n.4, p. 1505-11. 1995.

HAMEED, S. *et al.* Persistently autoantibody negative (PAN) type 1 diabetes mellitus in children. **Pediatr Diabetes.** v. 12, n.3 Pt 1, p. 142-9. 2011.

HAMMAN, R. F. *et al.* The SEARCH for Diabetes in Youth study: rationale, findings, and future directions. **Diabetes Care.** v. 37, n.12, p. 3336-44. 2014.

HANDWERGER, B. S.; FERNANDES, G.; BROWN, D. M. Immune and autoimmune aspects of diabetes mellitus. **Hum Pathol.** v. 11, n.4, p. 338-52. 1980.

HICKEY, C. M.; WILSON, N. R.; HOCHSTRASSER, M. Function and regulation of SUMO proteases. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 13, n.12, p. 755-66. 2012.

HOOGENDOORN, B. *et al.* Functional analysis of human promoter polymorphisms. **Hum Mol Genet.** v. 12, n.18, p. 2249-54. 2003.

HSU, P. C. *et al.* Association of Matrix Metalloproteinase-2 Promoter Polymorphisms With the Risk of Childhood Leukemia. **Anticancer Res.** v. 39, n.3, p. 1185-1190. 2019.

HUHTALA, P.; CHOW, L. T.; TRYGGVASON, K. Structure of the human type IV collagenase gene. **J Biol Chem.** v. 265, n.19, p. 11077-82. 1990.

- HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 15, n.12, p. 802-12. 2014.
- IDF. International diabetes federation. v. p. 2017.
- INTERNATIONAL HAPMAP, C. A haplotype map of the human genome. **Nature.** v. 437, n.7063, p. 21. 2005.
- INTERNATIONAL HAPMAP, C. *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature.** v. 449, n.7164, p. 851-61. 2007.
- JAMES, R. W.; POMETTA, D. Differences in lipoprotein subfraction composition and distribution between type I diabetic men and control subjects. **Diabetes.** v. 39, n.10, p. 1158-64. 1990.
- JOHNSON, E. S. Protein modification by SUMO. **Annu Rev Biochem.** v. 73, p. 355-82. 2004.
- KARSLIOGLU FRENCH, E.; DONIHI, A. C.; KORYTKOWSKI, M. T. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic syndrome: review of acute decompensated diabetes in adult patients. **Bmj.** v. p. l1114. 2019.
- KELLY, M. A. *et al.* Molecular aspects of type 1 diabetes. **Mol Pathol.** v. 56, n.1, p. 1-10. 2003.
- KESSLER, B. M.; EDELMANN, M. J. PTMs in conversation: activity and function of deubiquitinating enzymes regulated via post-translational modifications. **Cell Biochem Biophys.** v. 60, n.1-2, p. 21-38. 2011.
- KIM, D. L. *et al.* Is an Oral Glucose Tolerance Test Still Valid for Diagnosing Diabetes Mellitus? **Diabetes Metab J.** v. 40, n.2, p. 118-28. 2016.
- KIM, P. S. *et al.* A1C underestimates glycemia in HIV infection. **Diabetes Care.** v. 32, n.9, p. 1591-3. 2009.
- KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirao Preto. Online).** v. 43, n.1, p. 3-10. 2010.
- KIRSZTAJN, G. M.; BASTOS, M. G.; ANDRIOLO, A. Dia Mundial do Rim 2011. Proteinúria e creatinina sérica: testes essenciais para diagnóstico de doença

renal crônica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n.2, p. 100-103. 2011.

KLEINBERGER, J. W.; POLLIN, T. I. Undiagnosed MODY: Time for Action. **Curr Diab Rep**. v. 15, n.12, p. 110. 2015.

KNIP, M. *et al.* Prediction of type 1 diabetes in the general population. **Diabetes Care**. v. 33, n.6, p. 1206-12. 2010.

KNOWLER, W. C. *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**. v. 346, n.6, p. 393-403. 2002.

KOGA, M. 1,5-Anhydroglucitol and glycated albumin in glycemia. **Adv Clin Chem**. v. 64, p. 269-301. 2014.

KOJIC DAMJANOV, S.; DERIC, M.; EREMIC KOJIC, N. Glycated hemoglobin A1c as a modern biochemical marker of glucose regulation. **Med Pregl**. v. 67, n.9-10, p. 339-44. 2014.

KOMAR, A. A.; LESNIK, T.; REISS, C. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. **FEBS Lett**. v. 462, n.3, p. 387-91. 1999.

KOSOY, R.; CONCANNON, P. Functional variants in SUMO4, TAB2, and NFkappaB and the risk of type 1 diabetes. **Genes Immun**. v. 6, n.3, p. 231-5. 2005.

KRISHNAN, S. *et al.* Impact of type 1 diabetes and body weight status on cardiovascular risk factors in adolescent children. **The Journal of Clinical Hypertension**. v. 13, n.5, p. 351-356. 2011.

KRISHNAN, S. *et al.* Impact of type 1 diabetes and body weight status on cardiovascular risk factors in adolescent children. **J Clin Hypertens (Greenwich)**. v. 13, n.5, p. 351-6. 2011.

KUDLA, G. *et al.* Coding-sequence determinants of gene expression in Escherichia coli. **Science**. v. 324, n.5924, p. 255-8. 2009.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**. v. 19, n.19, p. 5444. 1991.

LAN, C. C. *et al.* Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. **Br J Dermatol**. v. 159, n.5, p. 1103-15. 2008.

LEE, J. Y. *et al.* The vicious cycle between transglutaminase 2 and reactive oxygen species in hyperglycemic memory-induced endothelial dysfunction. **FASEB J**. v. p. fj201901358RR. 2019.

LEE, S. W. *et al.* Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 69, n.2, p. 175-9. 2005.

LI, Q.; MCDEVITT, H. O. The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse. **Clin Immunol**. v. 140, n.1, p. 3-7. 2011.

LI, W.; HUANG, E.; GAO, S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. **J Alzheimers Dis**. v. 57, n.1, p. 29-36. 2017.

LIAO, Y. F. *et al.* Association of a functional polymorphism (C59038T) in GTP cyclohydrolase 1 gene and Type 2 diabetic macrovascular disease in the Chinese population. **J Diabetes Complications**. v. 24, n.5, p. 313-9. 2010.

LIBMAN, I. M. *et al.* Evidence for heterogeneous pathogenesis of insulin-treated diabetes in black and white children. **Diabetes Care**. v. 26, n.10, p. 2876-82. 2003.

LIBMAN, I. M. *et al.* Islet cell autoimmunity in white and black children and adolescents with IDDM. **Diabetes Care**. v. 21, n.11, p. 1824-7. 1998.

LIN, C. M. *et al.* The Relationship Between MMP-2 -1306C>T and MMP-9 -1562C>T Polymorphisms and the Risk and Prognosis of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in a Chinese Population: A Case-Control Study. **Cell Physiol Biochem**. v. 42, n.4, p. 1458-1468. 2017.

LIN, H. Y. *et al.* SUMO4 M55V variant is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 56, n.4, p. 1177-80. 2007.

LIU, J. W.; CHEN, D. Q. Correlations of MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms with the risk of hepatopulmonary syndrome in cirrhotic patients: A case-control study. **Kaohsiung J Med Sci**. v. 34, n.11, p. 634-642. 2018.

LIU, O. *et al.* MMP-2 gene polymorphisms are associated with type A aortic dissection and aortic diameters in patients. **Medicine (Baltimore)**. v. 95, n.42, p. e5175. 2016.

LIU, T. *et al.* NF-kappaB signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**. v. 2, p. 2017.

LIUTKEVICIENE, R. *et al.* The Role of Matrix Metalloproteinases Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. **Ophthalmic Genet**. v. 36, n.2, p. 149-55. 2015.

LIUTKEVICIENE, R. *et al.* Association of MMP-2 ((-)1306 C/T) Gene Polymorphism with Predisposition to Optic Neuritis and Optic Neuritis Together with Multiple Sclerosis. **Medicina (Kaunas)**. v. 54, n.2, p. 2018.

LIUTKEVICIENE, R. *et al.* Association of exudative age-related macular degeneration with matrix metalloproteinases-2 (-1306 C/T) rs243865 gene polymorphism. **Indian J Ophthalmol**. v. 66, n.4, p. 551-557. 2018.

MA, X. *et al.* 1,5-Anhydroglucitol Is Associated with Early-Phase Insulin Secretion in Chinese Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes Technol Ther**. v. p. 2015.

MAAHS, D. M. *et al.* Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 39, n.3, p. 481-97. 2010.

MALECKAS, A. *et al.* Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Scandinavian Journal of Surgery**. v. 104, n.1, p. 40-47. 2015.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. W. Do MHCII-presented neoantigens drive type 1 diabetes and other autoimmune diseases? **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n.9, p. a007765. 2012.

MAYER-DAVIS, E. J. *et al.* Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012. **N Engl J Med**. v. 376, n.15, p. 1419-1429. 2017.

MAZARELLO PAES, V. *et al.* Predictors of glycemic control in the first year of diagnosis of childhood onset type 1 diabetes: A systematic review of quantitative evidence. **Pediatr Diabetes**. v. 19, n.1, p. 18-26. 2018.

MEHTA, S. N. *et al.* Evaluation of 1,5-anhydroglucitol, hemoglobin A1c, and glucose levels in youth and young adults with type 1 diabetes and healthy controls. **Pediatr Diabetes**. v. 13, n.3, p. 278-84. 2012.



MEIJNIKMAN, A. S. *et al.* Not performing an OGTT results in significant underdiagnosis of (pre)diabetes in a high risk adult Caucasian population. **Int J Obes (Lond)**. v. 41, n.11, p. 1615-1620. 2017.

MIKSZTOWICZ, V. *et al.* Increase in MMP-2 activity in overweight and obese women is associated with menopausal status. **Climacteric**. v. 15, n.6, p. 602-6. 2012.

MOHAMMAD, G.; SIDDIQUEI, M. M. Role of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the development of diabetic retinopathy. **J Ocul Biol Dis Infor**. v. 5, n.1, p. 1-8. 2012.

MORGAN, A. R. *et al.* Analysis of MMP2 promoter polymorphisms in childhood obesity. **BMC Res Notes**. v. 4, p. 253. 2011.

MURUSSI, M. *et al.* Nefropatia diabética no diabetes melito tipo 2: fatores de risco e prevenção. **Brazilian archives of endocrinology and metabolism**. v. 47, n.3, p. 207-219. 2003.

MUZZIO, M. L. *et al.* Metalloproteases 2 and 9, Lp-PLA(2) and lipoprotein profile in coronary patients. **Arch Med Res**. v. 40, n.1, p. 48-53. 2009.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, Z.; ANSARI-POUR, N. The essentiality of reporting Hardy-Weinberg equilibrium calculations in population-based genetic association studies. **Cell Journal (Yakhteh)**. v. 17, n.2, p. 187. 2015.

NAYA, L. D.; ÁLVAREZ, E. D. Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**. v. 12, n.17, p. 935-946. 2016.

NEGRATO, C. A. *et al.* Increasing incidence of type 1 diabetes between 1986 and 2015 in Bauru, Brazil. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 127, p. 198-204. 2017.

NICE. **Diabetes (type 1 and type 2) in children and young people: diagnosis and management**. Disponível em: Acesso em: 07/02.

NICKERSON, D. A. *et al.* DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. **Nat Genet**. v. 19, n.3, p. 233-40. 1998.

NICOLAS, F. E. *et al.* RNA silencing: Recent developments on miRNAs. **Recent Pat DNA Gene Seq**. v. 3, n.2, p. 77-87. 2009.

NOBLE, J. A. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. **J Autoimmun.** v. 64, p. 101-12. 2015.

NOSO, S. *et al.* Association of SUMO4, as a candidate gene for IDDM5, with susceptibility to type 1 diabetes in Asian populations. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1079, p. 41-6. 2006.

NUNES, R. Citocinas de resposta Th1 e Th2 e diabetes mellitus tipo 1. **Brazilian Journal of Clinical Analyses.** v. 49, n.4, p. 359-64. 2017.

NUTTER, C. A.; KUYUMCU-MARTINEZ, M. N. Emerging roles of RNA-binding proteins in diabetes and their therapeutic potential in diabetic complications. **Wiley Interdiscip Rev RNA.** v. 9, n.2, p. 2018.

OGURTSOVA, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 128, p. 40-50. 2017.

ORBAN, T. *et al.* Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. **Diabetes Care.** v. 32, n.12, p. 2269-74. 2009.

PAGANI, F. *et al.* New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. **Hum Mol Genet.** v. 12, n.10, p. 1111-20. 2003.

PAPATHEODOROU, K. *et al.* Complications of Diabetes 2016. **J Diabetes Res.** v. 2016, p. 6989453. 2016.

PARIKKA, V. *et al.* Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. **Diabetologia.** v. 55, n.7, p. 1926-36. 2012.

PEARCE, S. H.; MERRIMAN, T. R. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. **Trends Mol Med.** v. 12, n.2, p. 90-8. 2006.

PEARSON, E. R. Type 2 diabetes: a multifaceted disease. **Diabetologia.** v. 62, n.7, p. 1107-1112. 2019.

PEETERS, S. A. *et al.* Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. **Cardiovasc Diabetol.** v. 14, p. 31. 2015.

PIETROPAOLO, M. *et al.* Cytoplasmic islet cell antibodies remain valuable in defining risk of progression to type 1 diabetes in subjects with other islet autoantibodies. **Pediatr Diabetes**. v. 6, n.4, p. 184-92. 2005.

PIHOKER, C. *et al.* Autoantibodies in diabetes. **Diabetes**. v. 54 Suppl 2, p. S52-61. 2005.

POTERYAEVA, O. N. *et al.* Changes in Activity of Matrix Metalloproteinases and Serum Concentrations of Proinsulin and C-Peptide Depending on the Compensation Stage of Type 2 Diabetes Mellitus. **Bull Exp Biol Med**. v. 164, n.6, p. 730-733. 2018.

PRICE, S. J.; GREAVES, D. R.; WATKINS, H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. **J Biol Chem**. v. 276, n.10, p. 7549-58. 2001.

PUGLIESE, A. Insulinitis in the pathogenesis of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 17 Suppl 22, p. 31-6. 2016.

QU, H. *et al.* Assessing the validity of the association between the SUMO4 M55V variant and risk of type 1 diabetes. **Nat Genet**. v. 37, n.2, p. 111. 2005.

REDDI, A. S.; CAMERINI-DAVALOS, R. A. Diabetic nephropathy. An update. **Arch Intern Med**. v. 150, n.1, p. 31-43. 1990.

REVEILLE, J. D. The genetic basis of autoantibody production. **Autoimmun Rev**. v. 5, n.6, p. 389-98. 2006.

RIFAI, N.; HORVATH, A. R.; WITTEW, C. T. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 6. St. Louis: Elsevier, 2018.

RITTER, A. M. V. *et al.* The rs243866/243865 polymorphisms in MMP-2 gene and the relationship with BP control in obese resistant hypertensive subjects. **Gene**. v. 646, p. 129-135. 2018.

ROBINSON, M. T. Nutrition evidence-based guidelines for treating hyperlipidemia in children with type 1 diabetes: a case presentation. **Diabetes Educ**. v. 35, n.3, p. 408-19. 2009.

RODRIGUEZ-LOPEZ, J. *et al.* Regulatory polymorphisms in extracellular matrix protease genes and susceptibility to rheumatoid arthritis: a case-control study. **Arthritis Res Ther**. v. 8, n.1, p. R1. 2006.

RYSZ, J. *et al.* Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in diabetic nephropathy. **J Nephrol.** v. 20, n.4, p. 444-52. 2007.

SABBATINI, A. R. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 -735C/T polymorphism is associated with resistant hypertension in a specialized outpatient clinic in Brazil. **Gene.** v. 620, p. 23-29. 2017.

SAGI, I. *et al.* Matrix metalloproteinase protein inhibitors: highlighting a new beginning for metalloproteinases in medicine. **Metalloproteinases In Medicine.** v. Volume 3, p. 31-47. 2016.

SAHA, A. *et al.* The role of Sp1 in IL-1beta and H. pylori-mediated regulation of H,K-ATPase gene transcription. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 295, n.5, p. G977-86. 2008.

SALE, M. M. *et al.* A genome-wide scan for type 2 diabetes in African-American families reveals evidence for a locus on chromosome 6q. **Diabetes.** v. 53, n.3, p. 830-7. 2004.

SALZMANN, J. *et al.* Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. **British journal of ophthalmology.** v. 84, n.10, p. 1091-1096. 2000.

SAUNA, Z. E. *et al.* Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. **Cancer Res.** v. 67, n.20, p. 9609-12. 2007.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. p. 2016.

SBD. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. p. 2018.

SCHAAN, B. D. A.; SILVA, A. M. V. D.; IRIGOYEN, M. C. C. Disfunção endotelial no diabetes melito e estados de resistência à insulina: papel do estresse oxidativo e potenciais oportunidades terapêuticas. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia = Brazilian archives of endocrinology and metabolism.** v. Vol. 54, p. p. 514-515. 2010.

SCHMIDT, A. M. E. A. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, p. 8807-11

1994.

SCHNURE, J. J.; LEAHY, J. L. Diabetic Ketoacidosis and Hyperosmolar Hyperglycemic State. v. p. 359-368. 2013.

SHARMA, K. L. *et al.* Higher risk of matrix metalloproteinase (MMP-2, 7, 9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) genetic variants to gallbladder cancer. **Liver Int.** v. 32, n.8, p. 1278-86. 2012.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 87, n.1, p. 4-14. 2010.

SHIMADA, C. S. **Patologia Clínica e Onco-hematologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v. 27 Suppl 3, p. S49-52. 2003.

SIGNORELLI, S. S. *et al.* Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. **Vasc Med.** v. 10, n.1, p. 1-6. 2005.

SILANDER, K. *et al.* A large set of Finnish affected sibling pair families with type 2 diabetes suggests susceptibility loci on chromosomes 6, 11, and 14. **Diabetes.** v. 53, n.3, p. 821-9. 2004.

SILVA, M. E. R. D.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.** v. p. 2008.

SINGH, B. *et al.* Immunomodulation and regeneration of islet Beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. **J Interferon Cytokine Res.** v. 31, n.10, p. 711-9. 2011.

SINGH, R. E. A. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia** v. 44, n.2, p. 129-46. 2001.

SINHA, N. *et al.* SUMO4 163 G>A variation is associated with kidney disease in Indian subjects with type 2 diabetes. **Mol Biol Rep.** v. 43, n.5, p. 345-8. 2016.

SNELL-BERGEON, J. K. *et al.* Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 95, n.6, p. 2868-76. 2010.

SPRANGER, J. *et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes.** v. 52, n.3, p. 812-7. 2003.

STECK, A. K. *et al.* Stepwise or linear decrease in penetrance of type 1 diabetes with lower-risk HLA genotypes over the past 40 years. **Diabetes.** v. 60, n.3, p. 1045-9. 2011.

STONER, G. D. Hyperosmolar Hyperglycemic State. **American family physician.** v. 96, n.11, p. 2017.

SUH, Y.; VIJG, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutat Res.** v. 573, n.1-2, p. 41-53. 2005.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 44, n.3, p. 169-174. 2008.

SUN, R. *et al.* MMP-2, TNF-alpha and NLRP1 polymorphisms in Chinese patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. **Mol Biol Rep.** v. 40, n.11, p. 6303-8. 2013.

TAVARES RIBEIRO, R.; PAULA MACEDO, M.; FILIPE RAPOSO, J. HbA1c, fructosamine, and glycated albumin in the detection of dysglycaemic conditions. **Current diabetes reviews.** v. 12, n.1, p. 14-19. 2016.

TAYLOR, R.; ZIMMET, P. Limitation of fasting plasma glucose for the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 4, n.5, p. 556-8. 1981.

TELES, S. A. S.; FORNÉS, N. S. Relação entre o perfil antropométrico e bioquímico em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. **Revista Paulista de Pediatria.** v. 30, n.1, p. 65-71. 2012.

THE INTERNATIONAL HAPMAP, C. The International HapMap Consortium. **Nature** v. 426, p. 8. 2003.

THRAILKILL, K. M. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. **Diabetes Care**. v. 30, n.9, p. 2321-6. 2007.

TRIDGELL, D. M. *et al.* Interaction of onset and duration of diabetes on the percent of GAD and IA-2 antibody-positive subjects in the type 1 diabetes genetics consortium database. **Diabetes Care**. v. 34, n.4, p. 988-93. 2011.

TSURUMARU, M. *et al.* Evidence for the role of small ubiquitin-like modifier 4 as a general autoimmunity locus in the Japanese population. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 91, n.8, p. 3138-43. 2006.

TUOMILEHTO, J. *et al.* Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N Engl J Med**. v. 344, n.18, p. 1343-50. 2001.

TURLEY, S. *et al.* Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. **J Exp Med**. v. 198, n.10, p. 1527-37. 2003.

UMPIERREZ, G.; KORYTKOWSKI, M. Diabetic emergencies - ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. **Nat Rev Endocrinol**. v. 12, n.4, p. 222-32. 2016.

USHER-SMITH, J. A. *et al.* The pathway to diagnosis of type 1 diabetes in children: a questionnaire study. **BMJ Open**. v. 5, n.3, p. e006470. 2015.

VAISHYA, S.; SARWADE, R. D.; SESHADRI, V. MicroRNA, Proteins, and Metabolites as Novel Biomarkers for Prediabetes, Diabetes, and Related Complications. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 9, p. 180. 2018.

VASKU, V. *et al.* Genotype association of C(-735)T polymorphism in matrix metalloproteinase 2 gene with G(8002)A endothelin 1 gene with plaque psoriasis. **Dermatology**. v. 204, n.4, p. 262-5. 2002.

VON HERRATH, M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. **Diabetes**. v. 58, n.1, p. 2-11. 2009.

WALLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends Immunol**. v. 34, n.12, p. 583-91. 2013.



WANG, D. G. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**. v. 280, n.5366, p. 1077-82. 1998.

WANG, Y. *et al.* Limitations of the current world health organization growth references for children and adolescents. **Food Nutr Bull**. v. 27, n.4 Suppl Growth Standard, p. S175-88. 2006.

WATKINS, R. A. *et al.* Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. **Transl Res**. v. 164, n.2, p. 110-21. 2014.

WENZLAU, J. M. *et al.* Mapping of conformational autoantibody epitopes in ZNT8. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 27, n.8, p. 883-6. 2011.

WENZLAU, J. M. *et al.* Changes in Zinc Transporter 8 Autoantibodies Following Type 1 Diabetes Onset: The Type 1 Diabetes Genetics Consortium Autoantibody Workshop. **Diabetes Care**. v. 38 Suppl 2, p. S14-20. 2015.

WENZLAU, J. M. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 104, n.43, p. 17040-5. 2007.

WINTER, W. E.; SCHATZ, D. A. Autoimmune markers in diabetes. **Clin Chem**. v. 57, n.2, p. 168-75. 2011.

WON, J. C. *et al.* 1,5-Anhydroglucitol reflects postprandial hyperglycemia and a decreased insulinogenic index, even in subjects with prediabetes and well-controlled type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 84, n.1, p. 51-7. 2009.

XAVIER, H. T. *et al.* [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**. v. 101, n.4 Suppl 1, p. 1-20. 2013.

XIANG, K. *et al.* Genome-wide search for type 2 diabetes/impaired glucose homeostasis susceptibility genes in the Chinese: significant linkage to chromosome 6q21-q23 and chromosome 1q21-q24. **Diabetes**. v. 53, n.1, p. 228-34. 2004.

YANG, J. *et al.* MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. **Int J Ophthalmol**. v. 3, n.2, p. 137-40. 2010.

YANG, Y. *et al.* Protein SUMOylation modification and its associations with disease. **Open Biol**. v. 7, n.10, p. 2017.

YING, L. *et al.* The metabolism and transport of 1,5-anhydroglucitol in cells. **Acta Diabetol.** v. 55, n.3, p. 279-286. 2018.

YU, C. *et al.* Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. **Cancer Res.** v. 64, n.20, p. 7622-8. 2004.

ZHANG, J. *et al.* Sumoylation Modulates the Susceptibility to Type 1 Diabetes. **Adv Exp Med Biol.** v. 963, p. 299-322. 2017.

ZIEGLER, R. *et al.* Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. **Diabetes.** v. 40, n.6, p. 709-14. 1991.

ZIMMET, P. Z. *et al.* Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. **Diabet Med.** v. 11, n.3, p. 299-303. 1994.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews.** v. 94, n.3, p. 909-950. 2014.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES

**Pesquisador:** Fabiane Gomes de Moraes Rego

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 24676613.6.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Patrocinador Principal:** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 655.477

**Data da Relatoria:** 21/05/2014

##### Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES

**Autora:** Dra Fabiane Gomes de Moraes Rego. **Equipe da Pesquisa:** Aline Borsato Hauser, Geraldo Picheth, Leticia Carneiro Gomes, Railson Henneberg, SUZANA NESI FRANÇA.

##### Objetivo da Pesquisa:

Dosar os biomarcadores de controle glicêmico com ênfase no 1,5 anidroglicitol e albumina glicada, perfil lipídico, função renal, função hepática, função hematológica, metabolismo do cálcio e vitamina D e anticorpos relacionados ao desenvolvimento do diabetes em crianças e adolescentes de escolas Estaduais de Curitiba e pacientes diabéticos e seus familiares atendidos pelo Hospital de Clínicas da UFPR.

Determinar as frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos genéticos relacionados ao diabetes e suas complicações. Associar as variações genéticas estudadas com os biomarcadores em estudo, com ênfase nos associados ao controle glicêmico e no perfil lipídico. Buscar novos biomarcadores laboratoriais ou moleculares para o diagnóstico precoce do diabetes em crianças e adolescentes.

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 280

**Bairro:** 2º andar

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR **Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 855.477

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto em questão prevê riscos para os pacientes como algum desconforto inerente à punção venosa, bem como riscos associados a coleta da amostra de sangue como hematomas e irritações locais e o desconforto em coletar os dados antropométricos das crianças e adolescentes que serão o grupo controle. Para os pesquisadores, não haverá riscos visto que os procedimentos analíticos a serem empregados são de domínio dos mesmos. Os procedimentos técnicos que serão empregados estão bem estabelecidos na literatura e não há relatos de riscos bem como dano ao meio ambiente. Há descrição de que os materiais utilizados no projeto serão armazenados, lavados e/ou descartados seguindo as normas vigentes de biossegurança e proteção ao meio ambiente. O projeto apresenta benefícios que permitirão a avaliação da utilização de biomarcadores que não estão contemplados na rotina laboratorial, permitindo novas perspectivas de acurácia no diagnóstico, monitoramento e conhecimento das características do diabetes no Brasil, beneficiando os afetados pela patologia, os profissionais de saúde envolvidos no processo de tratamento e o sistema público de saúde.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta cunho relevante haja visto que o diabetes é uma patologia que afeta 8% da população e principalmente o controle glicêmico é difícil principalmente em crianças e adolescentes. A assertiva de que é necessário estudar e avaliar múltiplos e diferentes marcadores em conjunto para a extração de elementos representativos que possam ser utilizados como biomarcadores de risco e ou proteção associados ao diabetes são o ponto central desta pesquisa. Portanto, novos biomarcadores proteicos e genômicos, associados a marcadores clássicos do diabetes como glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, 1,5 anidroglicitol (1,5AG), albumina glicada (AG), insulina e hemoglobina glicada, são elementos centrais nessa pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos exigidos por este CEP foram anexados. anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD, lembrando que a Resolução em vigor é a 466/2012/CNS, em substituição a 196/96/CNS.

**Recomendações:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento,

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -**



Continuação do Parecer: 655.477

encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS)

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

CURITIBA, 21 de Maio de 2014

---

**Assinado por:  
IDA CRISTINA GUBERT  
(Coordenador)**

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



## ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) DE DIABÉTICOS ACIMA DE 12 ANOS

### TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Adolescentes maiores de 12 anos e menores de 18 anos

**Título do Projeto:** AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES MELLITUS

**Responsável:** Fabiane Gomes de Moraes Rego (orientador)

**Local da Pesquisa:** Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná.

**Endereço:** Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Campus Jardim Botânico, Curitiba – PR

#### O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade (entre 12 e 18 anos), para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

#### Informação ao Paciente:

O objetivo desta pesquisa é estudar o perfil bioquímico e molecular de adolescentes das escolas de Curitiba visando uma melhor compreensão de doenças que possam afetar estes. Pesquisas como esta podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.

Caso você participe da pesquisa, os dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) serão necessários. Além disso, será necessário coletar uma amostra do sangue sua.

O sangue será coletado durante a visita na sua escola pela nossa equipe de pesquisadores, com necessidade de coleta específica para a pesquisa.

É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.

Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Sator de Ciências da Saúde/UFRP.  
Parecer CEP/SD-PB nº 655477  
na data de 21/05/2014

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento do perfil bioquímico e molecular dos adolescentes 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e tratamento de doenças ligadas a adolescentes. No entanto, nem sempre ele será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado, será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados pela própria equipe de pesquisadores.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Rubricas:  
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

#### Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe. Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: Fabiane Gomes de Moraes Rego (rego@ufpr.br), Geraldo Picheth (geraldopicheth@ufpr.br) e Aline Borsato Hauser (alinehauser@ufpr.br); farmacêuticos, poderão ser contatados

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Setor de Ciências da  
Saúde/UFPR.  
Parecer CEP/SD-PB.nº 655477  
na data de 21/05/2014



de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7251. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

#### DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

_____ NOME DO ADOLESCENTE	_____ ASSINATURA	_____ DATA
------------------------------	---------------------	---------------

_____ NOME DO INVESTIGADOR	_____ ASSINATURA	_____ DATA
-------------------------------	---------------------	---------------

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240  
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.  
Parecer CEP/SD-PB.nº 655477  
na data de 21/05/2014

### ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA ASSINATURA DOS PAIS

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Dr Suzana Nesi França e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o seu filho menor de idade, a participar de um estudo intitulado "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE *DIABETES MELLITUS*", que vai avaliar o perfil bioquímico e molecular do seu filho. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é estudar os aspectos genéticos envolvidos com o diabetes para uma melhor compreensão desta doença. Pesquisas como esta podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.
- b) Caso você autorize a participação de seu filho na pesquisa, os dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) serão necessários. Além disso, será necessário coletar uma amostra do sangue dele.
- c) O sangue do seu filho será coletado durante a consulta de rotina do irmão (diabético tipo 1) pela equipe de coletadores do Serviço de Endocrinologia Pediátrica e Adolescência do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com a necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que ele experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que serão totalmente avaliados e se necessário tratados sob a responsabilidade da equipe de coletadores do Hospital de Clínicas ou pela Dr Suzana Nesi França.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento do perfil bioquímico e molecular dos adolescentes 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e tratamento de doenças ligadas a adolescentes. No entanto, nem sempre ele será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, o sangue de seu filho menor de idade será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o material dele armazenado, será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) A amostra de sangue de seu filho menor de idade será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

**Rubricas:**

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

# ANEXO 4 - QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

## COLETA DE DADOS

Paciente nº \_\_\_\_\_

Registro HC: \_\_\_\_\_

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Data de nascimento: \_\_\_\_\_
3. Paciente ( ) Parente ( ) Parentesco: \_\_\_\_\_
4. Sexo Masculino ( ) Feminino ( )
5. Púbere ( ) Pré Púbere ( ) Tanner \_\_\_\_\_
6. CAD no diagnóstico Sim ( ) Não ( )
7. CAD no último ano Sim ( ) Não ( )
8. Consanguinidade Sim ( ) Não ( )
9. Idade de diagnóstico (meses ou anos) \_\_\_\_\_
10. Tempo de diabetes (meses) \_\_\_\_\_
11. Peso (kg) \_\_\_\_\_
12. Peso (DP) \_\_\_\_\_
13. Estatura (cm) \_\_\_\_\_
14. Estatura (DP) \_\_\_\_\_
15. IMC (kg/m<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_
16. IMC (DP) \_\_\_\_\_
17. Tipo de insulina: Análogo Sim ( ) Não ( )
18. Necessidade de insulina (U/kg/dia) \_\_\_\_\_
19. Tempo de tratamento com insulina:  
( ) Não tratado com insulina, ( ) tratado com até 6 meses depois diagnóstico, ( ) tratado mais de 6 meses depois do diagnóstico
20. Comorbidades : ( ) Doença tireoideana, ( ) Doença celíaca, Outros ( ) Qual \_\_\_\_\_
21. História familiar de Diabetes Sim ( ), (...) pais ou ( ) avós, Não ( )
22. História familiar de doença cardiovascular Sim ( ) Não ( )
23. Tipo de Pele Fitzpatrick I&II ( ) II&III ( ) IV&V ( )
24. Etnia: ( ) Euro-brasileiro, (...) Afro-brasileiro, ( ) Oriental, ( ) Outro
25. Média índice UV nos últimos 35 dias \_\_\_\_\_
26. Uso de fotoproteção \_\_\_\_\_
27. Uso de suplemento vitamínico Sim ( ) Não ( ) Qual? \_\_\_\_\_